

---

# ANNALES

DE

# L'INSTITUT PASTEUR

---

Mémoire publié à l'occasion du jubilé de E. Metchnikoff.

---

## QUELQUES NOTES

### SUR LA DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE

### DES ANOPHÉLINES ET DU PALUDISME, A SUMATRA

par le Dr N. H. SWELLENGREBEL (d'Amsterdam).

Après la découverte de Ross, que le parasite du paludisme est transmis par les moustiques du genre *Anopheles*, on crut d'abord que tous les représentants de ce genre sont capables de transmettre le paludisme. L'attention des médecins et des entomologistes étant attirée sur ce groupe d'insectes, on s'aperçut bientôt qu'il était beaucoup plus étendu qu'on ne le croyait et qu'il constituait non pas un simple genre, mais toute une famille contenant un grand nombre de genres.

Il fallait maintenant considérer la question suivante : Est-ce que tous les moustiques appartenant à la famille des Anophélines sont en état de transmettre le paludisme ou non ? Cette question n'est pas seulement d'importance académique, elle est aussi d'une valeur pratique : Supposons que, dans une région où sévit le paludisme, on trouve çà et là des gîtes à Anophélines ; par ici on trouve telle espèce, par là telle autre ; où faut-il commencer la lutte contre les moustiques ? Sont-elles toutes de la même importance, ou bien n'y a-t-il pas que quelques

espèces qui transmettent le virus palustre? Pour résoudre cette question, il faut d'abord considérer si les Anophélines qu'on étudie permettent le développement du parasite, puis il faut voir s'ils peuvent transmettre ce parasite. Mais cela ne suffit pas : on a démontré que l'Anophéline *peut* transmettre le paludisme et non qu'il est le vecteur le plus commun dans la région où on fait ses études. Pour prouver cela, il faut des données d'ordre biologique et épidémiologique.

Citons quelques exemples :

A Panama, Darling (1909) trouva sept espèces d'Anophélines, trois seulement sont capables de transmettre la fièvre paludéenne.

A Formose, Kinoshita (1906) nous donne la liste de sept espèces d'Anophélines. Quatre d'entre elles sont trop rares pour pouvoir jouer un rôle important dans la transmission du paludisme. Une autre qui peut transmettre la fièvre maligne ne se montre qu'en hiver quand les conditions pour la transmission sont peu favorables. Il n'en reste donc que deux qui sont d'importance pratique et qu'il faut détruire par tous les moyens possibles.

A l'île Maurice, Ross (1909) a trouvé trois espèces d'Anophélines. Une d'elles seulement a de l'importance ; des deux autres, l'une est trop rare pour en tenir compte et l'autre ne transmet pas le paludisme.

A Calcutta, Adie et Alcock (1903) ont trouvé que le moustique le plus commun est *Nyssomyzomyia rossii*, mais cette espèce ne transmet pas le paludisme (du moins pas à Calcutta). C'est un moustique beaucoup moins commun (*M. listoni*) qui est le vecteur du parasite. Cette observation montre qu'il est souvent difficile de trouver le vrai vecteur du virus palustre ; en se bornant à chercher et à détruire les Anophélines en général, sans tenir compte de l'espèce, on risquerait de perdre son temps et son argent dans une lutte infructueuse contre un moustique inoffensif, mais commun, sans atteindre le moustique rare, mais dangereux.

Ce n'est donc pas à juste titre que Eysell (1910) recommande aux médecins de diriger la lutte contre tous les Anophélines sans tenir compte de l'espèce. C'est vrai qu'il est souvent diffi-

cile de déterminer l'espèce quand on n'est pas spécialiste, mais cette difficulté ne doit pas être insurmontable.

Dans la présente Note, nous voulons exposer quelques faits et considérations relatifs à l'épidémiologie du paludisme à l'île de Sumatra (Indes Néerlandaises) qui montrent, une fois de plus, l'utilité d'une connaissance approfondie des espèces qui constituent la faune anophélienne du district qu'on veut étudier.

\*  
\* \*

L'île de Sumatra s'étend dans une direction de Nord-Ouest à Sud-Est, entre le 5° degré de latitude septentrional et le 5° degré méridional. Elle est séparée de la presqu'île de Malacca par le détroit de ce nom. Le climat est très humide (60-80 p. 100), la température varie de 27; à 32°.

On sait par les recherches de Watson (1910) qu'à Malacca, où règnent les mêmes conditions climatiques qu'à Sumatra, le paludisme est une des maladies les plus graves; il est donc bien étonnant qu'à Déli, province située à la côte orientale de Sumatra, juste en face de la ville de Klang, de l'autre côté du détroit de Malacca (où Watson a fait ses études), le paludisme soit de peu d'importance dans les grandes plantations de tabac, où travaillent plusieurs milliers de laboureurs indigènes.

La population anophélienne de Malacca est bien connue. Voici de quoi elle se compose d'après la dernière communication de Strickland (1913 a) :

<i>Myzomyia albirostris</i> .	<i>Patagiamyia umbrosus</i> .
<i>Nyssomyzomyia punctulata</i> .	<i>P. albotæniatus</i> .
<i>N. rossii</i> .	<i>Nyssorhynchus maculatus</i> .
<i>N. ludlowi</i> .	<i>N. karwari</i> .
<i>Neomyzomyia elegans</i> .	<i>N. fuliginosus</i> .
<i>Cristophersia halli</i> .	<i>Neosthetophela aitkenii</i> ,
<i>Myzorhynchus sinensis</i> .	
<i>M. barbirostris</i> .	et trois espèces incertaines.

M. Schüffner et nous, avons étudié la faune anophélienne de la plaine de Déli. Nous avons trouvé :

<i>Nyssomyzomyia rossii</i> .	<i>Myzorhynchus sinensis</i> .
<i>N. ludlowi</i> .	<i>M. barbirostris</i> .
<i>N. punctulata</i> .	<i>Patagiamyia albotæniatus</i> .
<i>Myzomyia albirostris</i> .	<i>P. umbrosus</i> .
<i>Neomyzomyia elegans (leucosphyrus)</i> .	<i>Cristophersia halli</i> .



On voit que cette liste ressemble à celle qu'a donnée Strickland, mais que *Patagiamyia umbrosus* est rare et que les représentants du genre *Nyssorhynchus* font défaut à Déli (1). D'après les recherches de Watson (1910), ce sont précisément ces espèces qui sont les vecteurs les plus importants du virus palustre à Malacca, *P. umbrosus* transmet la fièvre dans les plaines, les *Nyssorhynchus* — surtout *N. maculatus (wilmori)* — le font dans les montagnes.

Est-ce à cause de ce manque de vecteur convenable que le paludisme a si peu d'importance à Déli? Nous ne saurions l'affirmer, mais la supposition nous semble plausible.

On trouve cependant à Déli des patients souffrant du paludisme, surtout sur le littoral. C'est là qu'on trouve *N. rossii* et *N. ludlowi*; Schüffner (1902) et Banks (1907) ont démontré que cette dernière espèce peut transmettre les parasites du paludisme. Il semble cependant que ce moustique est beaucoup moins dangereux que *P. umbrosus*.

Dans l'intérieur du district de Déli, aux alentours de la ville de Médan, on trouve *M. sinensis* en abondance. D'après Kinoshita (1906), cette espèce transmet la fièvre tierce; mais, malgré la présence de cette espèce, les fièvres palustres manquent à Médan parmi les Européens, quoique leurs maisons soient à peu de distance des gîtes à Anophélines et que les porteurs de gamètes ne manquent pas parmi les indigènes. Est-ce que leur nombre est trop petit pour alimenter les sources d'infection, ou bien est-ce qu'à Déli *M. sinensis* ne transmet aucune forme de fièvre palustre? Nous ne savons là-dessus rien de précis; cependant, cette dernière supposition nous semble la plus probable.

M. Schüffner nous a fait remarquer qu'à Déli on trouve çà et là une augmentation notable des cas de fièvre palustre. Sur une des plantations notamment, ce fait est bien évident. Nous y avons trouvé *N. leucosphyrus* en abondance. D'après les renseignements de M. Schüffner qui, depuis plusieurs années, a fait une étude approfondie des moustiques de Déli, cette espèce doit être récemment importée parce que, jadis, elle faisait com-

(1) Plus tard, M. Schüffner a rencontré *N. maculatus* sur le plateau Batak (Sumatra central).

plètement défaut. *N. leucosphyrus* est la seule espèce anophélienne qu'on trouve dans cette plantation; il est donc probable (quoique pas prouvé) que c'est elle qu'il faut incriminer dans la transmission de la fièvre palustre. Si cela est vrai, ce fait offre un exemple frappant des changements nosographiques d'une région quelconque par l'introduction d'une espèce anophélienne nouvelle.

La côte occidentale de Sumatra ne se trouve pas dans les conditions favorables de la côte orientale. A Sibolga, M. de Vogel et nous avons étudié le paludisme qui sévit là d'une manière extrêmement grave. C'est une petite ville située aux bords de la mer, à côté d'un grand marécage marin à rhizophores. On a essayé de combler ce marécage, mais on n'a réussi qu'à en faire une collection de gîtes à Anophélines : dans le marécage primitif, l'eau de mer pénétrait à chaque marée et, avec elle, des poissons et d'autres ennemis des larves. Dans le marécage comblé, l'eau de mer ne peut plus pénétrer et c'est pour cela que les larves des moustiques y pullulent. Un peu plus loin, près du quartier des Européens, on trouve des rizières où il y a aussi des gîtes à Anophélines, mais ici l'eau est douce. Plus haut, dans la vallée qui s'étend dans les montagnes, on trouve de petits villages entourés de rizières qui sont toutes des gîtes à Anophélines.

Auprès du marécage, l'index de la rate est de 98 p. 100. En s'éloignant du marécage, l'index tombe à 89 p. 100 au quartier des Européens, et, en remontant la vallée, ce pourcentage s'abaisse graduellement de 60 à 45 p. 100. Donc, partout des gîtes à Anophélines et cependant l'index de la rate va en diminuant. En ne s'occupant que des Anophélines en général, il faudrait détruire les gîtes dans les rizières aussi bien que dans le marécage, et on serait tenté de commencer par les premiers, ceux-ci étant les plus faciles à supprimer. Et cependant, cela serait une mesure inutile, car les Anophélines des rizières sont d'espèce inoffensive : ce sont des *M. sinensis*, qui ne transmettent que la tierce bénigne, tandis qu'à Sibolga on trouve presque exclusivement la tierce maligne. Au contraire, dans le marécage comblé, on ne trouve qu'une seule espèce : *N. ludlowi*, qui transmet les fièvres palustres, comme l'a démontré Banks.

On a noté une exacerbation des fièvres après qu'on avait



comblé une partie du marécage. La pullulation extraordinaire des *N. ludlowi* qui en fut la suite, causa une augmentation considérable de vecteurs du virus palustre et ceci fut sans doute la cause de cette exacerbation.

Depuis que nous avons fait nos études à Sibolga, on a détruit les gîtes à *N. ludlowi*. Le quartier de la ville situé près de ces gîtes (où vivaient la plupart des porteurs de gamètes) ayant été détruit accidentellement par le feu, on a profité de ce malheur en reconstruisant ce quartier loin du marécage dangereux. On vient de nous informer que, depuis ce temps, le nombre des moustiques et des cas de fièvre a diminué considérablement.

Nos observations faites à Sibolga montrent une fois de plus comme il est dangereux de combler un marécage d'une manière imparfaite, en conservant de petites mares où les poissons ne peuvent vivre et où, par conséquent, les larves des Anophélines pullulent sans être dérangées. C'est là une expérience bien connue et ancienne : Laveran (1908) nous apprend qu'au milieu du <sup>xviii</sup><sup>e</sup> siècle, les États généraux des Provinces-Unies avaient inondé la contrée autour de la ville de Bréda pour protéger le pays contre l'invasion des Français ; après la guerre, on laissa couler l'eau et le pays devint sec, mais marécageux, et bientôt le paludisme s'annonça d'une manière tellement grave, qu'on dut inonder de nouveau le pays pour mettre fin à l'épidémie. A Semarang (Java), de Vogel (1907) trouva les étangs à poissons, le long de la côte, sans larves ; dans les vieux étangs à demi desséchés et sans poissons, il trouva des larves en abondance. Ces étangs-là étaient les gîtes des Anophélines vecteurs du virus palustre.

En comparant la faune anophélienne de la côte orientale (Déli) et occidentale (Sibolga), nous observons qu'elle se compose des mêmes éléments : *N. rossii*, *N. ludlowi*, *M. sinensis*. Cependant à Déli, *N. rossii* prédomine, *N. ludlowi* est plus rare. A Sibolga, c'est justement le contraire et c'est *N. ludlowi* qui est le plus commun. Ceci est d'accord avec l'affirmation que c'est le *N. ludlowi* et non *N. rossii* qui transmet les fièvres palustres.

Il faut bien se garder de généraliser les faits acquis en différents pays tropicaux. *N. maculatus*, si redoutable à Malacca, est tout à fait inoffensif sur le plateau Batak à 1.400 mètres ; un peu plus loin, aux bords du lac Toba, à 900 mètres, ce même

moustique transmet le paludisme (communication inédite de M. Schüffner). Cela montre combien est juste la remarque de Walker et Barber (1914) qu'il faut renouveler les recherches sur la transmission du paludisme, chaque fois qu'il s'agit d'un nouveau terrain d'exploration.

En résumant ces faits, nous observons qu'ils tendent tous à démontrer la nécessité, pour les médecins coloniaux pratiques, d'une étude approfondie de la faune anophélienne dans les régions tropicales. C'est elle qui nous explique souvent les différences de l'index endémique de régions voisines où règnent les mêmes conditions physiques, c'est elle aussi qui nous indique dans quelle voie il faut diriger la lutte contre les moustiques.

Mais, pour que cette étude soit fructueuse, il faut faciliter la détermination des Anophélines. La découverte, la description des *espèces nouvelles* appartiennent aux spécialistes, mais tout médecin pratique doit être en état de reconnaître les *espèces déjà connues*. Pour parvenir à cet idéal, il faut simplifier la nomenclature et bien relever les caractères saillants des espèces. Les États fédérés de Malaisie nous ont donné l'exemple (Strickland 1913 b) : il faut le suivre.

## BIBLIOGRAPHIE

- ADIE et ALCOCK (1905). — On the occurrence of *Myzomyia listoni* in Calcutta. *Proc. Roy. Soc.*, t. LXVI, B, n° 510, p. 319.
- BANKS (1907). — Experiments in malarial transmission, etc. *Philipp. Journ. of Science*, t. II, p. 513.
- DARLING (1909). — Transmission of malarial fever in the canal zone. *Journ. Americ. Med. Ass.* t. LIII, p. 2051.
- EYSELL (1910). — *Anopheles rossii*, ein gefährlicher Malariaüberträger. *Arch. f. Sch. u. Tropenhyg.*, t. XIV, p. 416.
- KINOSHITA (1906). — Ueber die Verbreitung der Anophelen auf Formosa, etc. *Eod. loc.*, p. 621, 676, 708, 744.
- LAVERAN (1908). — *Traité du paludisme*. Paris (Masson, éd.).
- ROSS (1909). — *Report on the prevention of malaria in Mauritius*. Londres (Churchill, édit.).
- SCHÜFFNER (1902). — Die Beziehung der Malariaparasiten zu Mensch und Mücke. *Zeitschr. f. Hygiene*, t. XLI, p. 89.
- STRICKLAND (1913 a). — A revised list of Malayan Anophelines. *Indian Journ. of Med. Research*, t. I, p. 203.
- STRICKLAND (1913 b). — Short Key to the identification of anopheline mosquitoes of Malaya. *Kuala Lumpur (Government printing office ed.)*.
- DE VOGEL (1907). — Anophélines dans l'eau de mer. *Atti della Soc. per gli Studi della Malaria*, t. VIII, p. 1.
- WALKER et BARBER (1914). — Malaria in the Philippine Islands. *Philipp. Journ. of science*, Sect. B, t. IX, p. 381.
- WATSON (1910). — The prevention of malaria in the Federated Malay States. Extr. de : *Prevention of malaria*, par R. Ross. Londres (Murray, éd.), p. 554.



## CONTRIBUTION TO THE STUDY OF DELAYED OR " LATENT " TUBERCULOUS INFECTION

by S. DELÉPINE,

Director of the Public Health Laboratory, University of Manchester.

In the course of an investigation which brought the writer face to face with certain aspects of latent infection, he observed some facts upon which the classical observations of Metchnikoff on Tuberculosis in the Meriones throws much light. Although the following speculative contribution is unworthy of the great master, its subject is not altogether inappropriate to the occasion which has caused it to be written.

The demonstration of the inoculability of Tuberculosis by Villemin, and the discovery of Koch's Bacillus, are the bases upon which our present knowledge of the etiology of Tuberculosis has been firmly established. It must, however, be acknowledged that these fundamental facts are not sufficient to explain fully the distribution of the disease. Our knowledge of the factors which, under ordinary circumstances, determine the incidence of the disease, is still very incomplete. The fact that under experimental conditions it is possible to produce tuberculosis in a normal animal by inoculation, inhalation or ingestion of pure cultures of tubercle bacilli, may for a short time have led some inexperienced observers to believe that the penetration of Koch's Bacillus into human tissues was sufficient in itself to produce Tuberculosis. If this were true, there would be very few persons free from the disease, for its bacillus is so widely distributed that the members of a civilised community who have not at one time or another inhaled or swallowed tubercle bacilli must be very few indeed.

The ubiquity of the tubercle bacillus has led certain statisticians to emit the view that, as regards the occurrence of



tuberculosis, the state of the possible victim is of primary importance, and that Koch's *Bacillus* must under normal circumstances be considered as a factor of secondary importance. That there is some element of truth in this paradoxical view cannot be entirely denied, but that it is fallacious is quite certain, for it is easy to prove that Tuberculosis cannot be produced without tubercle bacilli, and that all individuals are not equally exposed and liable to infection.

A belief in the fixity of the characters and properties of all the bacilli originally covered by the name of *Bacillus tuberculosis*, has led certain observers to assume the existence of a number of species or races of that organism. The quantitative pathogenicity of these kinds of bacilli constitutes for these observers the chief specific difference between these types. To speak only of Tuberculosis as it occurs in three vertebrata, there would be a human, a bovine and an avian kind of tubercle bacilli with fixed characters. The direct passage of Tuberculosis from birds to mammals and *vice versa* is certainly attended with difficulties, and the same may be said to a lesser degree of the passage of human bacilli to canine or bovine animals. But these difficulties, though usual, are not constant and the writer has observed instances of the direct intercommunicability of tuberculosis between mammals, and between birds and mammals. As to the intercommunicability of tuberculosis among mammals, the author's experience leaves him no room for doubt. In this respect he agrees with several eminent observers and does not think it necessary to do more than state his own views before dealing with the special object of this communication.

What renders the elucidation of the causes of an infectious disease so difficult is that it is necessary to take account of the various ways in which the predisposing and determining factors have combined in their action. These factors may be grouped under at least 6 heads :

- Distribution and habits of the pathogenic organism;
- Conditions influencing its number;
- Conditions influencing its virulence (pathogenicity, toxicity);
- Opportunities of access to channels of infection;

Conditions influencing the resistance of the possible host ;  
Frequency and completeness of recoveries from infection  
(occult or manifest).

Of the factors which determine the occurrence of infection and the course taken by the disease, there are two which are of special importance, viz., the resistance of the possible host to the infecting parasite, and the pathogenic power of the parasite itself. In the case of the tubercle bacillus, it has been demonstrated clearly, as has been previously noticed, that tubercle bacilli obtained from various kinds of animals are not usually equally pathogenic to certain experimental animals. As to the resistance of the host, apart from the different degrees of resistance which each kind of animal offers to bacilli coming from various other kinds of animals, there are various conditions which influence the resistance of individuals of the same species to any one type of bacillus.

The way in which the parasite and the host react upon each other can be studied most successfully when the infective power of the bacillus and the resistance of the host are almost equally balanced, as has been done by Metchnikoff in his classical study on experimental tuberculosis in the *Meriones*. His description of the struggle between the tubercle bacillus and the giant cell of the *Meriones* is very suggestive of what must happen if, for some reason or other, the physiological activity of either the cell or the bacillus is reduced or enhanced. The secretion by the bacillus of concentric layers of a protecting material, and the precipitation of calcareous salt in the parts of the giant cell which are, in all probability, affected by the bacillary toxins, indicate at least part of the mechanism of attack and defence.

In the course of experiments made with the view of ascertaining the effect which the action of various agents had upon the virulence (1) of tuberculous products of human and bovine sources, one is sometimes able to observe evidence of a reduction in the pathogenic power of bacilli, and this reduction may be sufficient to render the cobbay capable of resisting bacillary

(1) The word virulence is here used in its most general sense, including all that renders the organism capable of producing irritative and toxic lesions and of multiplying and spreading in its host.

invasion much in the same way as the *Meriones* resists the action of bacilli of normal pathogenic power.

For the purpose of estimating the effect which various agents have upon the virulence of a given strain of tubercle bacilli, the cobaye is eminently suitable, because this animal reacts readily and in a very uniform manner to tubercle bacilli obtainable from human, canine, bovine, equine, porcine and other mammalian tuberculous lesions, and in a certain proportion of cases, can also be infected with avian tuberculous products.

Subcutaneous inoculation on the inner aspect of the hind leg at the level of the femoro-tibial articulation with a pure culture or matter containing an extremely small number of bacilli produces in the cobaye typical lesions, the extent and distribution of which are of great value in determining the number and virulence of the bacilli. Subcutaneous inoculations in other parts of the body, or intraperitoneal injections yield much less comparable results.

As lesions appear in new organs, the older lesions increase in extent, passing through stages of necrosis, caseation, fibrosis, etc. At first the organs affected increase considerably in size, but after a time they show a tendency to contraction owing to the production of fibrous tissue and absorption of degenerated products.

The extent and distribution of the tuberculous lesions in an inoculated animal are determined by six factors at least :

1. The number of bacilli,
2. The virulence of the bacilli,
3. The time which has elapsed since infection,
4. The resistance of the animal to infection,
5. The seat of inoculation, and
6. The amount of damage done to the tissues at the time of inoculation.

For purposes of comparison some of these factors may be more or less successfully reduced to constants by suitable precautions.

The differences produced by time can be eliminated by examining the animals after a constant interval of time. The resistance of the animal can be made as constant as possible,



by using animals of the same race, age and weight, and keeping them previous to, and after, inoculation under identical conditions. It is obvious that in practice one is obliged to be satisfied with conditions which are only approximately similar. The seat of inoculation and the amount of damage done to the tissues can be made practically constant by due attention to details.

The only two factors which are necessarily variable are the number of bacilli and their virulence.

With the object of simplifying records one may sub-divide the development of experimental tuberculous lesions in the cobaye into four stages which are determined by the number and situation of tuberculous lesions *visible to the naked eye*. These stages are indicated by the lesions produced in a certain length of time by subcutaneous injection of 1/20th of a milligramme of a pure culture of tubercle bacilli of moderate virulence into the inner aspect of *one hind leg* at the level of the femoro-tibial articulation.

STAGE OF DEGREE	TIME after inoculation IN LEFT HIND LEG.	ORGANS AFFECTED WITH LESIONS visible in an ordinary DISSECTION
1.	Within 10 days. . .	Subcutaneous tissue at seat of inoculation, adjacent popliteal gland in left leg.
2.	10 to 20 days. . .	A. Left superficial and deep inguinal glands. Sacro-lumbar glands. B. Retrohepatic gland and spleen in addition to above.
3.	20 to 35 days. . .	Liver, lungs, bronchial glands, suprascapular glands, cervical glands on both sides of the body.
4.	35 days and after.	More complete invasion of the lymphatic glands in front of the diaphragm on both sides of the body. <i>Right</i> superficial and deep inguinal glands and other glands behind the diaphragm on the right side of the body.

It is obvious that the number of stages could be considerably increased, and that this would allow of the time periods being made more definite; four stages seem, however, sufficient for general purposes of comparison. It might, however,

be advantageous to divide the second stage into two sub-stages indicated by the letters A and B in the above table in which reference is made only to lesions visible to the naked eye after the organs have been exposed by dissection. It is however easy to prove, as the writer has done, that the lymphatic ganglia and other organs are affected several days before lesions are visible to the eye. To do this it is sufficient to test these organs by inoculating cobayes with them at various intervals after the original animal had been inoculated.

The results of some of these tests when a small number of bacilli is used may be summed up as follows :

The popliteal gland on the side inoculated is usually infective 48 hours after inoculation ;

The superficial inguinal glands are usually infective from 72 to 96 hours after inoculation ;

The spleen is usually infective from 96 to 120 hours after inoculation.

The extent of the lesions is influenced both by the duration of life after inoculation and by the number of bacilli in the material tested. To ascertain the influence of the number of bacilli, four cobayes were inoculated with the sediment of equal quantities of various dilutions of a sample of milk obtained from a cow with advanced tuberculosis of the udder. At the end of 15 days these four cobayes were killed and tuberculous lesions were found in each. There was a distinct relation between the amount of the tuberculous milk (and, therefore, of tubercle bacilli) and the extent of the lesions as is shown by the following table.

DILUTION	QUANTITY OF ORIGINAL MILK contained in the MATERIAL INOCULATED	APPROXIMATE NUMBER of TUBERCLE BACILLI	DEGREE OF TUBERCULOSIS observed AT THE END OF 15 DAYS (*)
1/100.000	0 c. c. 0002	At least 30	2nd A. Lesions small.
1/10.000	0 c. c. 002	At least 300	2nd A. to B. ditto.
1/1.000	0 c. c. 02	At least 3.000	2nd B.
1/100	0 c. c. 2	At least 30.000 <sup>1)</sup>	3rd Lesions larger.

(\*) As indicated by lesions visible to the naked eye.

It would appear that the number of bacilli has a greater influence on the size of the lesions than on the spread of infection. Time has greater influence on the spread.

By the method previously described, it is possible to show that under the influence of certain agents the normal virulence of tubercle bacilli may be considerably reduced. It is also possible to demonstrate that the virulence of bacilli obtained at different times from sources of a similar kind is capable of a considerable variation.

Thus a certain strain of tubercle bacilli, obtained from a human lesion and exhibiting normal virulence so long it was cultivated on blood serum at the optimum temperature, produced only slight and slow spreading lesions after being kept absolutely dry in the dark for 2 months. After dessiccation for a period of over 4 months, the same bacillus was incapable of producing any infective lesion. Other cultures were affected in the same way, but some were able to resist desiccation for longer periods. Pathological products such as tuberculous sputa, pus, milk are affected in a similar way by drying.

The action of radiant sunlight is so rapidly lethal that it is not easy to regulate the exposure so as to determine accurately the reduction in the virulence of the bacilli.

A reduction of virulence was also observed in the case of tuberculous milk kept at a low temperature (below 6°C.) in the dark for a considerable time. This milk, which had been collected with aseptic precautions and direct from a tuberculous udder in a sterilized vessel, contained a large number of virulent tubercle bacilli and a few other bacteria. When fresh it produced extensive uncomplicated tuberculosis in cobayes inoculated subcutaneously with it. The lesions were as usual extensive in all the lymphatic ganglia connected with the seat of inoculation 3 weeks after the inoculation. After this milk had been kept for 490 days (1), as stated above, it was still

(1) The same milk was tested again after being kept 4 1/2 years, when it was found that the bacilli were all dead or at any rate incapable of producing tuberculosis. Cobayes inoculated with large quantities of this milk, remained well for over 1 year after inoculation and all their organs were found healthy *post mortem*.



capable of producing tuberculosis, but the mode of spread of the infection was anormal. In the subcutaneous tissue and subjacent muscles in the neighbourhood of the seat of inoculation on the inner aspect of the leg, a large number of small isolated or confluent tubercles formed during the first month, and it was only towards the end of the first month that the inguinal glands began to enlarge. When the cobayes were killed, 3 months after inoculation, it was found that the tissues on the inner aspect of the thigh and the abdominal walls, including the peritoneum, in the corresponding inguinal region were the seat of a very large number of small fibro-caseous tubercles, almost confluent; the lymphatic glands behind the diaphragm were not more affected than is generally found to be the case 3 or 4 weeks after inoculation, but the liver, spleen, the lungs and most of the lymphatics in front of the diaphragm were the seat of extensive tuberculous lesions.

There appeared, therefore, to have been during the first month a tendency to a localisation of the infective process, but afterwards the infective organisme which had been able to pass beyond the locality first affected, must have regained their virulence and power to multiply, for the organs situated at a distance from the seat of inoculation showed lesions resembling closely those observed in the course of normal infection.

Similar effects were observed in the case of tuberculous cultures and tuberculous milk which had been heated for a definite length of time up to temperatures approaching lethal temperatures.

While conducting in 1899 a series of experiments on the sterilization of milk artificially infected with tubercle bacilli of human and of bovine origin, the writer observed that cobayes inoculed with milk which had been submitted to certain temperatures for a certain length of time remained apparently free from infection for several weeks, but that ultimately they became tuberculous. This delayed infection was observed when the milk had been heated to :

65° C. for 180 minutes (3 hours).

70° C. — 45 —

74° C. — 30 —

76° C. — 10 —

85° C. — 15 — (In this case there was a delay of 2 months).

These experiments were conducted with very great care as if the object had been to ascertain the coagulation temperature of a proteid. (This fact is of some importance in view of the statements which have been made as to the lethal effect of a temperature of 85°C.)

These experiments were repeated in 1911 with naturally infected milk obtained from the tuberculous udder of a cow. This milk was highly pathogenic when fresh, 0,2 gramme of it being capable of producing in 15 days a tuberculous ulcer at the seat of inoculation, well marked tuberculosis of the popliteal, superficial and deep inguinal, sublumbar and renal lymphatic ganglia corresponding to the leg inoculated and distinct tuberculous lesions of the retrohepatic, bronchial, suprascapular ganglia and of the spleen, liver and lungs.

Some of that milk was divided into 2 parts, one of which was kept for control experiments and the other heated in a steam jacketted copper pan, provided with a stirrer by means of which the milk was kept in constant motion, the temperature of the fluid was recorded by means of a well tested and controlled recording thermometer during the experiment. In the course of 8 minutes the temperature rose from 58°C. to 78°C., and was for 4 minutes above 68°C. A sample of that milk was collected as soon as the temperature had reached 78°C. The same milk was heated for 10 minutes more, the temperature rising gradually to 92°C. when a second sample was taken.

3 sets of cobayes were inoculated subcutaneously with the original milk and with the same milk after it had been heated to 78°C. and 92°C. respectively. The quantity of untreated milk inoculated was 1 cc.; the quantity of treated milk was very much larger, the sediment of 40 ccs. obtained by centrifugalisation being used. The animals inoculated with these samples were examined frequently during life and the lesions recognisable by inspection and palpation noted. After the death of the animals they were dissected carefully and the various organs examined for tubercle bacilli.

The following summary gives the results of the observations made.

STUDY OF DELAYED OR « LATENT » TUBERCULOUS INFECTION 609

	GROUP I — CONTROL UNHEATED	GROUP II — MILK HEATED TO 78°	GROUP III — MILK HEATED TO 92°
End of 1st week.	No distinct lesions except slight swelling at seat of inoculation.	No distinct lesions except slight swelling at seat of inoculation.	No distinct lesions except slight swelling at seat of inoculation.
End of 2nd week.	Well marked subcutaneous nodule beginning to ulcerate at seat of inoculation. Distinct swelling and induration of inguinal ganglia.	<i>Ditto.</i>	<i>Ditto.</i>
End of 3rd week.	Large subcutaneous indurated nodule and distinct ulcer at seat of inoculation. Superficial inguinal very large and indurated.	No trace of local lesion recognisable by palpation. Doubtful enlargement of superficial inguinal ganglia.	No trace of local lesion recognisable by palpation. Doubtful enlargement of superficial inguinal gland.
End of 4th week.	Ulceration spreading. Superficial inguinal ganglia very large and indurated.	<i>Ditto.</i>	<i>Ditto.</i>
End of 5th week.	<i>Ditto.</i>	<i>Ditto.</i>	<i>Ditto.</i>
End of 6th week.	Animal dead. All lymphatic ganglia with well marked tuberculous lesions. Also tuberculosis of spleen, liver and lungs.	<i>Ditto.</i>	<i>Ditto.</i>
End of 7th week.	.....	<i>Ditto.</i>	<i>Ditto.</i>
End of 8th week.	.....	<i>Ditto.</i>	<i>Ditto.</i> + doubtful subcutaneous induration.
End of 9th week.	.....	<i>Ditto.</i>	<i>Ditto.</i>
End of 10th week.	.....	No trace of local lesion recognisable by palpation. Doubtful enlargement of superficial inguinal ganglia.	No trace of local lesion recognisable by palpation. Doubtful enlargement of superficial inguinal gland.



	GROUP I — CONTROL UNHEATED	GROUP II — MILK HEATED TO 75°	GROUP III — • MILK HEATED TO 92°
End of 11th week. ....		Animal killed. No local lesion. Slight enlargement of popliteal. Slight tuberculous lesions of inguinal sublumbar lymphatics and spleen. Tubercle bacilli found in all these lesions.	Animal killed. Slight local lesion, no ulceration. Inguinal and sublumbar glands very slightly enlarged, a few tubercle bacilli in above lesions. Other lymphatic ganglia, spleen, liver, lungs were the seat of extensive tuberculous lesion containing many tubercle bacilli

Another group of experiments was conducted in which thin layers of milk were heated and evaporated at the same time. The temperature of the milk was raised from about 12°C. to 98°C. in less than 3 minutes, the material not being kept at the higher temperature for more than 3 seconds.

\*  
\* \*

The results of inoculation were practically the same as in the previous experiments. A cobaye, killed 5 weeks after inoculation, *i. e.* at a time when some indication of inguinal swelling had begun to be noticeable, was found to have very slightly enlarged popliteal inguinal and sublumbar lymphatic ganglia, tubercle bacilli being demonstrable in each. There was no sign of any lesion at the seat of inoculation. The lesions were similar to those observable from 8 to 10 days after inoculation with unheated milk.

The two last sets of experiments may be summed up as follows :

1. Cobayes inoculated with untreated tuberculous products rich in bacilli, developed at the seat of inoculation extensive tuberculous lesions in 2 weeks

2. Cobayes of the same size and kept under identical conditions as the last, after being inoculated with a much greater quantity of the same tuberculous products previously heated as stated above, developed very slight lesions at the seat of inoculation in the course of 11 weeks.

3. The viscera and the majority of the lymphatic ganglia of the cobayes inoculated with the untreated tuberculous products, were the seat of extensive tuberculous lesions 6 weeks after inoculation.

4. In the cobayes inoculated with the heated tuberculous products, the viscera and lymphatic ganglia were affected nearly to the same extent as those of the cobayes inoculated with the untreated material, but this result was obtained after 11 weeks only.

5. From these results it would appear that the heated bacilli were at first barely capable of overcoming the resistance offered to them by the phagocytes in the region first infected, but that some bacilli had escaped and had been carried away probably by some of the migratory cells. These bacilli had been able to multiply and to regain their pathogenic power.

6. The facts observed seem also to indicate that the recuperation of this pathogenic power became more marked as the distance from the seat of inoculation increased, for, while the local lesions remained insignificant, those of distant organs were practically as extensive as those found in the animals inoculated with untreated milk.

7. The relation between the extent of the tuberculous lesions and the distance from the seat of inoculation, indicates that the bacilli which had successfully overcome the various obstacles offered to their progress, had gradually become not only more numerous but also more virulent. This suggests strongly a process of *reinforcement of virulence by relays*, similar to that observed in the production of a "Virus fixe" by passage through a series of animals according to Pasteur's method.

8. In the experiments referred to in this paper, the period of latency did not exceed 3 or 4 weeks, but it was sufficiently long to reveal an aspect of infection processes which must be

of great importance, more specially in relation to latent infections.

9. The fact that tubercle bacilli were still living and capable of a modified pathogenic action after being kept for nearly 500 days in a natural tuberculous product (milk), supports the view that under certain circumstances tubercle bacilli are still infective after remaining dormant for a considerable period of time.



**NOUVELLES RECHERCHES**  
**SUR LA CONTAGION DE LA TUBERCULOSE**  
**PAR L'AIR EXPIRÉ PENDANT LA TOUX**

par le Dr P. CHAUSSÉ.

Dans divers mémoires publiés successivement depuis 1909, nous nous sommes proposé d'étudier les conditions spéciales de la contagion de la tuberculose par les voies respiratoires.

Ayant d'abord analysé et commenté tous les travaux originaux de Cornet, de Flügge et de leurs élèves ou collaborateurs (1), nous avons constaté que ni l'un ni l'autre de ces expérimentateurs n'ont édifié sur des bases scientifiques satisfaisantes leurs conceptions respectives.

Le premier incriminait exclusivement, ou presque, la contagion par les particules sèches issues des crachats disséminés par le malade. Mais il ne donnait à l'appui de cette opinion, d'ailleurs plausible et sans doute exacte au moins en partie, devait-on penser alors, que des recherches démontrant la virulence des poussières dans les chambres de phthisiques, et une seule expérience de brossage de crachats secs, en présence de cobayes qui devinrent tuberculeux.

Dès ce moment même, plusieurs objections devaient être faites à la thèse du savant médecin allemand.

Il convenait de remarquer d'abord que la virulence des poussières, constatée par lui, dans une partie des chambres de malades, pouvait également provenir de l'émission de particules liquides, pendant la toux ou la parole, ainsi que Flügge le prétendit dix ans plus tard, ces particules liquides pouvant se

(1) P. CHAUSSÉ, La contagion de la tuberculose par les particules sèches. Histoire et critique de la théorie de Cornet. *Revue d'hygiène et de police sanitaire*, du 20 avril 1913.

P. CHAUSSÉ, La contagion de la tuberculose par les particules liquides. Histoire et critique de la théorie de Flügge. *Revue d'hygiène et de police sanitaire*, du 20 juin 1913.

déposer peu de temps après leur projection dans l'air, se dessécher, se pulvériser et rester dangereuses pendant une longue période. La vitalité du bacille dans les crachats secs, déterminée par nous depuis peu, était alors supposée fort longue; elle est en tout cas suffisante pour que cette objection doive être faite.

En second lieu, Cornet infectait des cobayes dans des conditions particulièrement favorables, en brossant sur un tapis, *avec un balai rude*, une grande quantité de crachats desséchés pendant deux jours. Il est certainement arbitraire d'identifier ces conditions avec celles de la contagion naturelle sans pousser plus loin les investigations à ce sujet. Cette identification nous apparaîtra encore plus douteuse lorsque nous aurons rappelé qu'un an avant Cornet, en 1887, Cadéac et Mallet (1) échouaient, au contraire, dans leurs tentatives d'infection du cobaye, avec les crachats secs, à forte dose également, et réussissaient toujours avec le crachat frais et dilué, puis pulvérisé à l'état liquide. Ces deux auteurs français concluaient que le crachat frais et dilué est incomparablement plus dangereux, au point de vue de la contagion, que le crachat desséché.

Malgré l'in vraisemblance, et ne possédant aucun commencement de preuve, l'auteur allemand se déclare néanmoins partisan de la transmission naturelle de la phthisie par les poussières issues des crachats desséchés, conclusion qui n'était pas scientifiquement possible. Il conclut ainsi parce que, malgré tout, il fallait bien expliquer la contagion par inhalation; la contagion par les gouttelettes n'étant pas alors envisagée, il était indiqué, quels que fussent les résultats expérimentaux, d'incriminer les poussières de crachats qui semblaient être la seule forme respirable du virus. Sa doctrine ainsi émise par voie d'exclusion, Cornet la défendit plus tard contre les attaques de l'École de Flügge; mais il n'apporta depuis cette époque aucune nouvelle expérience qui en établît le bien-fondé. C'est nous qui en démontrerons l'exactitude vingt-cinq ans plus tard, sans exclure toutefois la contagion par les particules liquides.

De nouveau, en 1903-1907, la théorie de Cornet fut sérieuse-

(1) CADÉAC et MALLET, Sur différents modes de transmission de la tuberculose. *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 12 juin 1887; *Congrès contre la tuberculose*, 1888, p. 310.

ment attaquée par Peterson (1), d'une part, et par Cadéac (2), d'autre part. Ces deux auteurs, ayant procédé à des épreuves d'inhalation de crachats desséchés, à doses fort élevées, n'obtinrent presque que des résultats négatifs. C'est pourquoi, au Congrès de 1905, Cadéac formula l'avis que les poussières de crachats sont inertes, lorsqu'elles sont devenues mobilisables par suite de la dessiccation prolongée. Hâtons-nous de dire, cependant, que Cadéac n'avait procédé à aucune recherche sur la vitalité du virus dans les crachats secs, et que l'assertion ainsi émise n'était pas basée sur des documents probants. Mais, en considérant seulement les résultats négatifs obtenus malgré l'inhalation de grandes quantités de poussières de crachats, tant par Cadéac que par Peterson, on est amené à croire que ces poussières, si elles se forment dans les conditions ordinaires de la vie familiale, sont inoffensives; c'est là le sens des conclusions formulées par le professeur Cadéac; il en résulte que la manière de voir de Cornet ne semble plus défendable.

En 1897, Flügge, ayant pensé à la possibilité de la formation de particules liquides très fines dans les voies respiratoires supérieures et surtout dans la bouche, au niveau des lèvres, crut devoir combattre la doctrine hypothétique de Cornet et proposa au monde médical la théorie non moins exclusive de la contagion par les gouttelettes de salive ou de crachats formées, suppose-t-il, pendant la toux, la parole ou le chant. Chose surprenante encore, cet auteur ne s'appuie que sur des résultats d'expériences faites avec le *B. prodigiosus*; il n'a personnellement réalisé aucune expérience d'inhalation de virus tuberculeux! Ce furent ses élèves, peu expérimentés, semble-t-il, qui, dans les années suivantes, après la publication de la thèse de la contagion par les gouttelettes, ou, plus exactement, de l'hypothèse, firent quelques expériences peu ou pas démonstratives avec des crachats tuberculeux et avec des malades. L'ordre normal des faits fut ainsi renversé.

(1) PETERSON, Cité par Kuss, dans le *Bulletin médical*, du 5 août 1908, et par Bang, au Congrès contre la tuberculose, tenu à La Haye, en 1909. Nous n'avons trouvé nulle part l'indication bibliographique relative à ce travail de Peterson, qui n'a peut-être pas été publié.

(2) CADÉAC. Infection par les voies respiratoires. *Congrès contre la tuberculose*, Paris, 1905, vol. I, p. 411; et *Journal de médecine vétérinaire*, d'octobre 1905.

A la lecture des travaux des élèves de Flügge, on constate à diverses reprises que les conclusions ne sont pas conformes aux résultats expérimentaux ; ces jeunes expérimentateurs, ayant à charge de confirmer les idées publiées par leur maître, forcent visiblement leurs conclusions dans le sens qui lui est favorable. D'autre part, si nous analysons successivement les travaux de cette école, nous n'y trouvons nulle part ce que l'on doit appeler *la preuve expérimentale* de la transmissibilité de la tuberculose par les particules liquides. Parmi ces recherches, les plus importantes sont celles de B. Heymann, élève de Flügge, mais nous répétons qu'elles ne sont pas probantes, loin de là (1), et nous prions le lecteur de se reporter, s'il le désire, soit à ces travaux originaux de B. Heymann, soit à l'analyse et à la critique que nous avons publiées de la doctrine de Flügge (*Revue d'hygiène et de police sanitaire*, du 20 juin 1913).

Après Cornet et après Flügge, et leurs élèves, le problème de la contagion tuberculeuse restait donc tout entier à élucider. Et cela nous est démontré, d'autre part, en ce que, postérieurement aux travaux de ces deux auteurs, la théorie de la transmission par les voies digestives a pu momentanément, de 1903 à 1910 environ, faire oublier celle de la transmission par inhalation, laquelle cependant a, de beaucoup, le premier rôle chez l'homme et le bœuf, d'après nos recherches personnelles, publiées depuis 1909 jusqu'à ce jour.

Il est superflu d'ajouter que les thèses de Cornet et de Flügge ne s'excluent en aucune façon, tout au moins sur la base des travaux parus jusqu'ici.

Sans nous en dissimuler les difficultés, nous avons essayé de résoudre ce problème dont la solution doit servir de base à la prophylaxie antituberculeuse, méthode de l'avenir dont il faut, selon nous, attendre les meilleurs résultats.

Il convient de rechercher, séparément et successivement, les possibilités de transmission par les crachats secs et par les crachats frais, tels qu'ils sont expectorés, et d'apprécier le danger de contagion auprès du malade. C'est à ce travail que nous avons consacré tout notre temps depuis quelques années.

(1) B. HEYMAN, *Zeitschrift für Hygiene*, 1899, 1901 et 1908 ; vol. 30, 38 et 60.



Et voici quelles ont été les étapes principales de nos acquisitions, d'abord en ce qui concerne le virus desséché :

PREMIER POINT. — *La vitalité du bacille tuberculeux dans les crachats desséchés dans les conditions de l'appartement est de 10 à 25 jours si on fait l'épreuve par inhalation, de 30 à 60 jours si on procède par inoculation sous-cutanée au cobaye (Académie des Sciences, 26 août 1912; Revue de la tuberculose, 5 octobre 1913).*

DEUXIÈME POINT. — A la limite de la virulence par inhalation, et à partir du 10<sup>e</sup> jour environ par inoculation sous-cutanée, *le bacille donne des tuberculoses atténuées, à évolution ralentie, avec de faibles lésions viscérales et avec une caséification plus ou moins incomplète des tissus (Revue de la tuberculose, 5 février 1914).*

Par conséquent, dans la contagion naturelle, d'après ces deux résultats, nous pouvons dire que *la vitalité du virus est suffisante dans les crachats secs pour assurer la transmission*, si d'autres conditions nécessaires interviennent : fragmentation et mobilisation du virus dans l'atmosphère, sous forme de particules respirables.

De plus, la faculté d'obtenir des tuberculoses atténuées, par inhalation de virus sec, peut expliquer les modalités cliniques, aiguës, subaiguës ou chroniques, de la maladie spontanée.

TROISIÈME POINT. — Nous avons démontré expérimentalement, ce qui n'avait pas été fait jusqu'ici de manière satisfaisante et probante, que *les conditions mécaniques agissant couramment dans la vie familiale (brossage, agitation de linges souillés, froissements divers de tissus souillés), sont parfaitement suffisantes pour fragmenter le crachat sec en particules respirables qui infectent l'atmosphère (Académie de Médecine, 20 mai et 22 juillet 1913).*

QUATRIÈME POINT. — A cette démonstration dont on peut déjà tirer des conclusions pratiques très importantes, nous avons ajouté la suivante : *le mouchoir du tuberculeux, pris sous son oreiller, sans aucune préparation spéciale, tel qu'il est utilisé par les malades, est apte à transmettre la maladie pendant une vingtaine de jours au plus, mais cette aptitude est décroissante du 1<sup>er</sup> au 20<sup>e</sup> jour. Le danger de contagion par ce linge est démontré en l'agitant quelques instants en présence de cobayes,*

dans une caisse; ces cobayes contractent ainsi une tuberculose de type respiratoire (Ces Annales, septembre et octobre 1914),

CINQUIÈME POINT. — *Les cobayes séjournant dans des chambres de phisiques, pendant la réfection des lits, et en l'absence des malades sortis depuis la veille au soir, contractent la tuberculose, évidemment par inhalation des poussières mobilisées*; les lésions de ces cobayes sont de type respiratoire (Ces Annales, 1914).

SIXIÈME POINT. — *L'inoculation des poussières recueillies dans les chambres de tuberculeux, a communiqué la tuberculose au cobaye dans plus du tiers des cas* (Ces Annales, 1914).

La virulence des poussières avait été constatée par Cornet; nous la confirmons en ajoutant que *les cobayes ainsi infectés ont des lésions à évolution ralentie*, indiquant que le virus est atténué et, par conséquent, a subi une dessiccation de quelque durée; il s'agit donc de particules bacillaires desséchées depuis quelques jours, et non de gouttelettes virulentes fraîchement émises.

SEPTIÈME POINT. — *Des épreuves de cohabitation de cobayes avec des malades contagieux nous ont démontré la contagiosité extrême de la maladie*; dans une expérience, notamment, nous avons obtenu l'infection par inhalation de 15 cobayes sur 19 après un mois de cohabitation, les cobayes étant au pied des lits, à 3 mètres environ de la bouche des malades (Ces Annales, 1914).

Ces résultats positifs peuvent être dus à la fois aux particules sèches et aux gouttelettes. Contre ce dernier mode d'infection, nous remarquons cependant que *les résultats positifs n'ont pas été plus nombreux, mais au contraire moins nombreux lorsque les cobayes séjournèrent plus près de la bouche des malades, à 80 centimètres ou 1 mètre seulement*.

Constatant ainsi que la tuberculose est plus contagieuse que cela n'est admis jusqu'ici, cela nous engage à rechercher si cette contagion est le fait du virus frais ou du virus desséché, et nous montre l'intérêt de cette recherche.

Ces diverses acquisitions établissent définitivement trois conclusions :

1° *La transmissibilité de la tuberculose par les particules provenant des crachats desséchés* dans les conditions de l'appartement; le virus sec s'est montré d'une activité extrême, jusqu'ici

insoupçonnée, au point que le professeur Cadéac croyait à l'innocuité des crachats secs spontanément pulvérisés.

2° *La haute contagiosité de la tuberculose dans les conditions ordinaires de l'entretien des malades.*

3° *La contagiosité de la tuberculose* PAR INHALATION *dans la cohabitation avec le tuberculeux humain, et, par conséquent, l'origine respiratoire de la phtisie humaine.* Cette origine respiratoire, tant discutée, est ainsi démontrée exacte expérimentalement.

En effet, *tous nos cobayes devenus tuberculeux dans ces conditions ont été infectés par inhalation, car ils présentent des lésions du type respiratoire le plus net*, telles que nous les avons obtenues maintes fois et les obtenons à volonté, avec une précision aussi rigoureuse qu'il est nécessaire, et sans aucune chance d'erreur, par pulvérisation de virus tuberculeux frais ou desséché, en répandant dans une atmosphère limitée des particules virulentes.

Sans nous préoccuper pour le moment de savoir s'il s'agit de gouttelettes ou de poussières, nous pouvons affirmer que ces expériences prouvent que l'atmosphère de l'appartement du tuberculeux est chargée de bacilles; or, une atmosphère virulente infecte par inhalation et non par ingestion.

Dans la même atmosphère infectante, nous avons constaté que les diverses espèces sont infectées simultanément et pareillement, par inhalation. Il est superflu d'ajouter que l'espèce est indifférente, quant au mode d'infection réalisé, et que ce sont des conditions purement physiques et passives qui déterminent l'accessibilité du poumon aux particules en suspension dans l'air. Les particules respirables n'ont que 2 à 20  $\mu$  environ. Dans l'appareil respiratoire de l'homme et des animaux, les dimensions relatives des conduits les plus fins sont peu différentes, et il n'y a aucun dispositif chez l'homme, ni chez aucune autre espèce, qui puisse réaliser une filtration de l'air inhalé, séparer les particules respirables et pathogènes, et empêcher leur accès aux alvéoles pulmonaires.

C'est pourquoi nous pouvons conclure que *l'être humain sain qui séjournera dans le voisinage d'un tuberculeux, qui respirera cette atmosphère contenant des bacilles, sera nécessairement infecté par inhalation*, et avec d'autant plus de certitude que

cet être humain inhale de 30 à 250 fois plus d'air que le cobaye. *Les résultats obtenus avec le cobaye sont aussi probants à l'égard de la contagion naturelle, que si nous avions opéré avec des hommes comme sujets d'expérience.*

Enfin ces résultats paraîtront d'autant plus démonstratifs qu'ils sont confirmés par les documents *nécropsiques*, lesquels démontrent que l'homme et l'enfant présentent, dans la règle, une tuberculose de type respiratoire tout comme nos cobayes ayant cohabité avec des tuberculeux humains.

Ainsi est donnée la preuve expérimentale de l'origine respiratoire habituelle de la phtisie humaine.

\*  
\* \*

Il reste à apprécier, comparativement avec ce qui précède, le rôle des particules liquides; c'est là la dernière partie sur laquelle portent nos investigations.

D'un grand nombre d'expériences cependant variées, mais avec résultats généralement négatifs, qui ont consisté :

1° A faire tousser des malades en face de boîtes de Petri découvertes contenant un liquide stérile qui fut ensuite inoculé à des cobayes;

2° A faire passer de l'air à vitesse variable dans des crachats tuberculeux et à faire respirer cet air par des cobayes;

3° A faire tousser des tuberculeux cavitaires dans un pavillon conduisant dans une caisse de 86 litres contenant des cobayes.

Nous avons cru devoir conclure que le rôle des particules liquides directement projetées pendant la toux du malade nous paraissait très restreint, et que la contagion a lieu uniquement, ou presque uniquement, par les particules sèches libérées des crachats pendant les 20 premiers jours environ de leur dessiccation.

C'est sur cette dernière conclusion que nous désirons revenir aujourd'hui, car de nouvelles expériences relatives aux particules liquides, qui sont un perfectionnement de la principale épreuve ci-dessus, nous imposent de la modifier.



\*  
\* \*

Depuis notre dernière publication sur la contagion tuberculeuse (*Annales de l'Institut Pasteur*, septembre et octobre 1914), un doute était né dans notre esprit à propos de nos expériences d'inhalation directe par le cobaye, de l'air expiré par des tuberculeux au moment de la toux. Comme nous attachions une grande importance à cette partie de nos recherches, nous décidâmes de refaire ces expériences, bien qu'elles fussent déjà nombreuses, en perfectionnant la méthode employée. Rappelons plus explicitement, en quelques mots, quelles ont été ces expériences, et nous ferons ensuite comprendre pourquoi nous avons décidé de les répéter dans des conditions plus sévères et plus démonstratives.

Notre caisse de 86 litres était de forme prismatique et rectangulaire : longueur, 60 centimètres; largeur, 40 centimètres; hauteur, 36 centimètres (1). Elle pouvait contenir aisément une cage avec 8 ou 10 cobayes de bonne taille, ou 14 cobayes de 3 à 4 mois environ.

Cette caisse était percée à l'un des bouts, dans la région supérieure, d'un trou rond de 7 centimètres de diamètre, dans lequel était soudé un tube très court portant extérieurement un pavillon en forme d'entonnoir, large de 20 centimètres à son ouverture extérieure par rapport à la caisse.

À la même extrémité, sur une autre ouverture, était adapté un tube plus étroit, de 25 millimètres environ de diamètre, dit tube de décompression. Lorsque le malade toussait dans le pavillon même, en face de l'ouverture de 7 centimètres donnant dans la caisse, l'air venant des poumons pénétrait en partie dans cette caisse, et, comme il ne pouvait évidemment y rester comprimé, il en chassait aussitôt, par le tube de décompression, une quantité d'air intérieur égale à celle introduite par la toux. En mettant une flamme en face du tube de décompression, extérieurement, on constatait qu'à chaque mouvement de toux cette flamme était soufflée vigoureusement et souvent éteinte.

Pendant les expériences, les cobayes placés dans la caisse inhalaient ainsi un air mélangé avec l'air expiré par le tuberculeux; la richesse de l'air de la boîte, en gaz venant des voies respiratoires du malade, augmentait de plus en plus, à chaque effort de toux, du début à la fin de l'expérience. Finalement, après environ 100 à 150 efforts de toux, l'air de la caisse était constitué en grande partie, sinon en totalité, par celui venant des poumons des malades. Dans les 8 expériences faites avec cet appareil, les malades ont toussé : 30, 50, 100, 150, 167, 250, 320 et 503 fois.

Dans la recherche du danger de contagion par les particules liquides c'était bien là l'expérience critère qu'il fallait réaliser,

(1) Voir *Annales de l'Institut Pasteur*, 30 juillet 1914, 2<sup>e</sup> mémoire (fig. 5).

et personne ne l'avait faite, tout au moins dans de bonnes conditions; notre méthode était de beaucoup préférable à tout ce qui avait été fait dans ce sens par nos prédécesseurs, mais nous allons constater cependant qu'elle ne nous donna pas de résultats satisfaisants pour cet ordre de recherches.

B. Heymann (1) avait exposé des cobayes à une distance de 25 à 40 centimètres de la bouche de phtisiques, mais à l'air libre, et de telle sorte que ces cobayes pouvaient inhaler simultanément toutes les particules sèches venant des malades ou de leur lit; néanmoins, cet auteur conclut, sans y être nullement autorisé, en faveur de la transmission par les particules liquides pour la raison qu'il a obtenu dans ces conditions l'infection de quelques sujets. Or nous avons traduit le travail original de B. Heymann et constaté qu'en outre, pour plusieurs des cobayes considérés comme tuberculeux, l'infection était douteuse.

Cadéac et Mallet (1887) avaient fait inhaler par des lapins de l'air expiré par des phtisiques : les résultats furent entièrement négatifs. Mais l'air ainsi donné en inhalations au lapin était recueilli dans des ballons de caoutchouc qu'on remplissait seulement à moitié, et dont on achevait le remplissage avec de l'air atmosphérique pur. D'autre part, cet air venant du malade était celui expulsé dans la respiration calme, normale, ce qui ne permet aucune conclusion à l'égard de l'air expiré pendant la toux et ne renseigne, par conséquent, aucunement sur le danger de contagion. Dans la toux, en effet, les crachats sont agités et entrent en contact intime avec l'air; les conditions sont toutes différentes de celles de la respiration normale. Enfin, durant le transport des sacs de caoutchouc contenant l'air suspect, les particules qui auraient pu se trouver dans l'air avaient le temps de se déposer et l'air de se purifier. Aucune conclusion, fondée sur ces résultats négatifs, n'était donc possible en ce qui concerne l'émission de particules liquides.

Or, si le malade émet des particules liquides fines pouvant être inhalées, il est évident que le seul moyen de le savoir est de faire inhaler IMMÉDIATEMENT, par le cobaye, l'air expulsé au moment de la toux; mais, pour éviter la cause d'erreur venant du malade, il faut recueillir cet air dans un récipient, à sa sortie des voies respiratoires et empêcher les animaux d'expériences d'inhaler les poussières venant du malade, de son linge, de son lit ou de la chambre dans laquelle on opère. Nous disons que l'inhalation d'épreuve doit être immédiate parce qu'il est fort possible que lesdites particules, si elles existent, se déposent en quelques minutes, ou même en quelques secondes.

Avec la caisse à inhalation plus haut décrite, nous avons

(1) B. HEYMAN. *Zeitschrift für Hygiene*, 1899, vol. 30, p. 139.

*effectué 8 expériences dans lesquelles, au total, 12 phthisiques, choisis parmi les plus contagieux, ont toussé 1.570 fois dans le pavillon de la boîte; 79 cobayes, en 8 séries, ont été soumis à l'inhalation directe de l'air expiré par ces malades pendant la toux; sur ce nombre d'animaux, un seul a contracté un tubercule pulmonaire primitif.*

Sans être affirmatif, nous fûmes porté à admettre que cet unique cas d'infection était dû à une particule sèche venant de l'un ou de l'autre de nos malades, et cela avec d'autant plus de raison, que nos autres résultats expérimentaux étaient négatifs pour la plupart en ce qui concerne les gouttelettes.

Nous avons cru devoir recommencer ces expériences, — et, en cela, la suite démontre que nous eûmes grandement raison, — parce que *la quantité d'air inhalé, venant du malade et rentrant dans notre caisse à inhalation, à chaque mouvement de toux, était indéterminée.* L'introduction d'air était bien certaine, mais nous ignorions la proportion qui, à chaque fois, se substituait à une quantité égale d'air de la caisse, pour vicier celui-ci progressivement, et peut-être pour le rendre infectant. Il faut dire, d'autre part, que nous ne savions pas ce que nos malades consentiraient à faire sur nos indications et que ce fut là une raison pour laquelle nous fûmes porté à faire ces expériences d'une manière aussi anodine que possible, ce qui, en cette circonstance, en a modifié sensiblement les résultats.

Cela étant connu, voici le nouveau *modus faciendi* et les résultats de 18 nouvelles épreuves d'inhalation de l'air expiré par le malade pendant la toux.

\*  
\* \*

Notre nouvelle caisse à inhalation, que nous appellerons caisse 16, est d'une capacité de 46 lit. 500 : longueur, 30 centimètres; largeur, 29<sup>cm</sup>5; hauteur, 18<sup>cm</sup>7.

Mais, pendant l'expérience, cette capacité est réduite en réalité à 40 litres au plus, par le fait que nous mettons dans cette caisse de 7 à 12 cobayes d'environ 500 grammes; la capacité se trouve encore réduite par une gorge rectangulaire nécessaire pour la fermeture hermétique, par un petit plancher en grillage de fil de fer sur lequel sont les cobayes, par un plateau rectangulaire contenant de la glace en partie fondue (fig. 2), et qui, à lui seul, représente au moins 500 cent. cubes.

Comparée à la caisse de 86 litres utilisée précédemment, la caisse 16, prête pour chaque expérience, a une capacité d'air respirable inférieure à

10 litres, soit 8 fois moins que la première, car celle-ci contenait environ 80 litres d'air respirable.

La première modification est donc une réduction de capacité, d'où il résulte qu'en peu de temps, les cobayes exposés inhaleront, à l'état de pureté, l'air rejeté par le malade.



FIG. 1. — Photographie du dispositif employé pour ces nouvelles expériences d'inhalation de l'air expiré pendant la toux. (Exp. V et VIII; malade Tei..., dix-sept ans). Le malade tousse dans un gros tube de verre adapté sur le tube de caoutchouc; l'air expiré rentre dans la caisse, se mélange à l'air y existant et en chasse par l'ouverture inférieure, ou de sortie, une quantité équivalente à celle introduite. E, orifice d'entrée de l'air; S, orifice de sortie; V, verre destiné à recevoir les expectorations qui seront examinées après l'expérience. 1, 2, 3, 4 : flèches indiquant le chemin parcouru par l'air expiré.

La seconde modification concourt au même but : au lieu de tousse dans un pavillon, le malade tousse dans un tube de verre de 30 millimètres environ de diamètre; il pose ses lèvres sur l'ouverture de ce tube de verre au moment où il se prépare à tousse. Le tube de verre se continue par un tube de caoutchouc, de 35 centimètres environ de longueur, adapté sur un



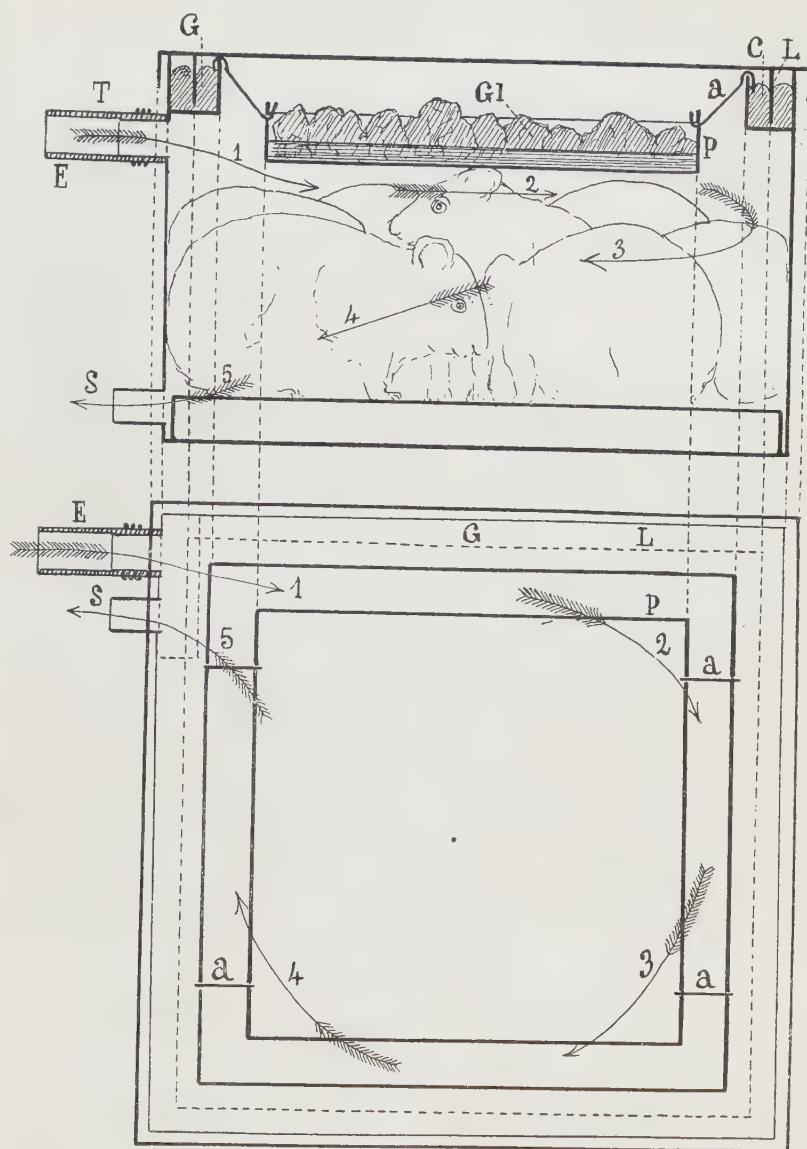


FIG. 2. — Schéma de la caisse 16 à inhalation, en élévation et projection sur un plan horizontal. Cette figure montre que l'air projeté par le malade décrit dans la caisse un circuit à hauteur des narines des cobayes; les conditions semblent donc excellentes pour cette épreuve; E, tube d'entrée de l'air; S, tube de sortie; G, gouttière de fermeture remplie de coton non hydrophile; C, coton; L, lame métallique appuyant sur le coton; P, plateau à glace; Gl, glace; a, attaché-support du plateau de glace; 1, 2, 3, 4, 5, flèches indiquant la direction du courant aérien.

tube métallique très court, de 22 millimètres environ de diamètre, qui s'ouvre dans la caisse à inhalation, à la partie supérieure et sur le côté.

Lorsque la toux s'annonce, le malade porte le tube de verre à ses lèvres, comme on y adapte l'embouchure d'un instrument à vent en cuivre, mais avec cette différence que, le tube de verre étant large, l'air projeté par la toux pénètre directement, sans résistance et en totalité, dans la caisse 16.

D'après son point de pénétration et sa direction horizontale, nous pouvons déduire que l'air introduit à chaque effort de toux décrit un tour complet de la caisse en se mélangeant à l'air y contenu, et provoque la sortie, par un tube de décompression S, placé en bas, du côté du malade, d'un volume d'air égal à celui expiré et introduit dans la caisse. A chaque toux, l'air nouveau arrive un peu au-dessus ou à hauteur de la tête des cobayes, condition éminemment favorable pour ces expériences.

Pendant le temps de l'expérience, un verre placé à la gauche du malade est à sa disposition pour cracher; les crachats sont ensuite examinés sur tout quant à leur teneur en bacilles. Bien entendu, cet examen a déjà été pratiqué antérieurement, et tous les malades utilisés ici sont choisis parmi

plus riches en bacilles et les plus contagieux; ce nouvel examen est fait uniquement à titre de contrôle et pour plus de certitude.

Les 8 à 12 cobayes employés à chaque fois ont tout juste la place indispensable. L'air de la caisse est saturé d'humidité, d'une part par la respiration des cobayes, d'autre part par l'air venant des poumons des malades, et enfin par la fonte de la glace placée dans le plateau, à la partie supérieure. Cette glace est ajoutée pour que les cobayes ne soient pas incommodés par la chaleur humide; car, à défaut de cette précaution, l'air intérieur de la caisse serait porté rapidement à 37-39° et s'y maintiendrait sans doute.

Dans ces expériences, nous avons généralement fait tousser un seul malade pour chacune, mais parfois aussi 2 et 3 malades successivement. Étant donnée la capacité restreinte de la caisse 16, et sachant qu'à chaque toux un malade expulse de 500 cent. cubes à 1 litre d'air, et quelquefois 1.200 cent. cubes, le gaz intérieur atteint rapidement une grande richesse en air expiré par le malade; après 20 à 30 efforts de toux, on peut considérer que l'air intérieur respirable se compose uniquement de l'air venant des poumons du malade et ayant pris contact, *dans les conditions naturelles*, avec les mucosités bacillaires, pendant la toux.

Ces expériences ont été faites, d'une part, avec 13 malades choisis parmi les plus contagieux du service de notre excellent maître le professeur M. Letulle, d'autre part avec 8 malades de

l'hôpital civil de Versailles, appartenant aux services des D<sup>rs</sup> Laurent et Weill. Nous exprimons à notre maître, ainsi qu'aux D<sup>rs</sup> Laurent et Weill, notre sincère reconnaissance pour l'intérêt qu'ils prirent à nos recherches et le bon accueil qui nous fut toujours réservé.

Les crachats des malades employés contenaient respectivement les quantités suivantes de bacilles par milligramme de produit humide, tel qu'il est expulsé :

## HÔPITAL BOUCICAUT :

Mag. . . . .	33 ans. . . . .	69.000 bacilles.
Ber. . . . .	42 ans. . . . .	48.500 —
Bar. . . . .	22 ans. . . . .	23.000 —
Cou. . . . .	38 ans. . . . .	33.700 —
Sav. . . . .	32 ans. . . . .	76.000 —
Gor. . . . .	37 ans. . . . .	46.500 —
Bour. . . . .	24 ans. . . . .	15.000 —
Chan. . . . .	52 ans. . . . .	22.500 —
Tei. . . . .	47 ans. . . . .	106.000 —
Los. . . . .	66 ans. . . . .	39.000 —
Dag. . . . .	26 ans. . . . .	36.000 —
Mot. . . . .	38 ans. . . . .	32.000 —
Mer. . . . .	33 ans. . . . .	41.000 —

## HÔPITAL DE VERSAILLES :

Chat. . . . .	19 ans. . . . .	4.500 —
Laz. . . . .	37 ans. . . . .	6.900 —
Trein. . . . .	42 ans. . . . .	10.500 —
Som. . . . .	45 ans. . . . .	5.000 —
Lem. . . . .	46 ans. . . . .	6.500 —
Leco. . . . .	44 ans. . . . .	3.600 —
Jour. . . . .	48 ans. . . . .	300 —
Bur. . . . .	42 ans. . . . .	80 —

Tous ces malades étaient des phtisiques avérés, depuis longtemps, à la période d'élimination, et la plupart étaient parmi les plus contagieux. Ils présentaient diverses formes de phtisie, les plus jeunes étant atteints de formes aiguës, les plus âgés de formes fibreuses, catarrhales, emphysémateuses.

Cependant, au point de vue de la contagion, nous avons tenu à opérer avec quelques malades dont les crachats fussent relativement peu riches en bacilles, car il importe de se rendre compte du danger dans tous les cas, et non pas seulement dans ceux où ce danger est le plus grand.

Ces renseignements préliminaires généraux étant fournis, voici ce qui concerne chaque expérience en particulier, avec ses résultats.

EXPÉRIENCE I. — Elle est faite le 13 août 1913 avec deux malades : Mag..., 69.000 bacilles par milligramme de crachat frais ; Gor..., 46.500 bacilles. La caisse étant préparée avec 8 cobayes, le premier malade tousse 50 fois en 40 minutes ; le deuxième malade vient à son tour et tousse 156 fois en 25 minutes. Avant d'opérer, chaque malade a eu les lèvres et la figure lavées avec du coton trempé dans une solution de sublimé tiède et, après chacun de ces malades, le tube de verre et celui de caoutchouc ont été désinfectés.

Les crachats du premier malade sont épais, purée de pois, nummulaires, peu aérés ; ceux du second, qui tousse beaucoup, par quintes, sont surtout muqueux, peu purulents, très aérés, parce que le malade est emphysémateux et a la toux fréquente.

En tout, la caisse 16 reçoit l'air chassé par 200 efforts de toux ; chaque toux donne au moins, en moyenne, 600 cent. cubes, soit en tout 123 litres d'air, chiffre qui est certainement plus faible que la réalité : pour être près de la vérité, il faudrait compter environ 800 cent. cubes par toux, mais nous préférons être en dessous du chiffre vrai, pour ne rien exagérer.

Les cobayes sont retirés de la caisse 5 minutes après que le dernier malade a cessé de tousser, ce qui fait 1 h. 10 minutes d'inhalation.

Un cobaye est mort le lendemain. Les 7 survivants ont été sacrifiés le 27 septembre, soit 45 jours après l'inhalation. Sur ce nombre, 4 cobayes étaient parfaitement sains et 3 étaient tuberculeux, avec des lésions de type respiratoire net, et ils présentaient respectivement 1, 1 et 2 tubercules pulmonaires primitifs. Ils avaient tous les trois de fortes adénopathies caséuses correspondantes et des lésions récentes de généralisation, à peine visibles et faciles à distinguer des tubercules primitifs.

Dans cette expérience et toutes celles qui suivent, lorsque nous disons qu'il s'agit de tuberculose d'inhalation pure, cela signifie que les ganglions cervicaux et mésentériques ne sont pas lésés, et que l'on trouve des lésions thoraciques primitives consistant en un ou plusieurs tubercules larges de 4 à 5 millimètres environ, fortement caséux. A cette période, de telles lésions se distinguent aisément, par leur volume, des tubercules secondaires de généralisation qui commencent à apparaître et qui sont des granulations grises ayant un demi à un millimètre. De même les adénopathies primitives correspondantes sont volumineuses et caséuses à un haut degré, et les ganglions ont leur volume décuplé. La généralisation n'a ordinairement pas produit d'adénopathies secondaires, mais, lorsqu'il en existe, on les distingue aisément en ce que la caséification y débute à peine, tandis que, dans les adénopathies primitives, elle est très marquée.



EXPÉRIENCE II. — Réalisée le même jour, de la même manière, avec 8 cobayes et 2 malades ; la caisse a été, au préalable, lavée avec un désinfectant dans toutes ses parties.

Les 2 malades sont : Ber..., 48.500 bacilles par milligramme, et Bar..., 23.000 bacilles par milligramme de crachats. Le premier tousse 70 fois en 45 minutes ; il a des crachats peu purulents, surtout muqueux, aérés ; le second tousse seulement 23 fois en 50 minutes ; ses crachats sont épais, nummulaires, fortement purulents, et ils sont aisément expectorés.

Les cobayes ont inhalé en tout, pendant 4 h. 50 minutes, l'air expulsé par 93 efforts de toux, soit 55 litres d'air.

Un des cobayes périt 15 jours plus tard ; il ne présente pas de lésions visibles ; mais il faut 20 à 25 jours pour que des tubercules ainsi contractés commencent à être visibles.

Les 7 cobayes restants sont sacrifiés le 27 septembre 1915, soit 45 jours après l'expérience. *Sur ce nombre, 6 sont indemnes et un seul présente un tubercule pulmonaire primitif avec adénite caséuse correspondante volumineuse et des lésions de généralisation récente.*

EXPÉRIENCE III. — Même dispositif avec 9 cobayes ; cette expérience est faite le 14 août 1915 avec 2 malades : 1<sup>o</sup> le malade Co... (33.700 bacilles par milligramme) qui tousse 63 fois en 40 minutes ; 2<sup>o</sup> le malade Sa... (76.000 bacilles par milligramme) qui tousse 67 fois en 38 minutes.

Il convient de noter que le premier, réformé sans avoir fait campagne, est atteint de laryngite bacillaire ; ses crachats sont muco-purulents, épais, nummulaires. Le deuxième n'a pas de laryngite spécifique, mais il expectore des mucosités analogues.

Les cobayes ont subi l'inhalation pendant 4 h. 25 minutes ; la caisse a reçu, pendant ce temps, l'air provenant de 130 efforts de toux, soit environ 77 litres d'air.

Un cobaye meurt 14 jours après et n'est reconnu atteint d'aucune lésion visible.

Les 8 survivants sont sacrifiés le 28 septembre, soit 45 jours après l'expérience. *Tous ces animaux sont atteints de tuberculose d'inhalation pure avec de fortes adénopathies pulmonaires caséuses*, et des lésions récentes de généralisation. Le nombre des tubercules pulmonaires primitifs varie de 1 à 3, selon les sujets ; nous comptons pour chaque cobaye respectivement : 1, 1, 1, 2, 2, 2, 3 et 3 tubercules primitifs, soit en moyenne de 2 par cobaye.

EXPÉRIENCE IV. — Exécutée aussi le 14 août 1915 avec 3 malades et 9 cobayes.

Le malade, Gor..., déjà utilisé pour l'expérience I. Ce malade tousse 210 fois en 35 minutes ; après lui, le malade Bo... (15.000 bacilles par milligramme), tousse 70 fois en 30 minutes ; il a la toux forte mais ne crache pas beaucoup. Enfin, le malade Cha... (22.500 bacilles par milligramme), tousse 135 fois en 29 minutes ; il expulse des mucosités nummulaires et a la toux forte.

Au total les cobayes ont inhalé pendant 4 h. 45 minutes l'air provenant de 415 efforts de toux, soit environ 249 litres d'air venant des poumons de 3 malades. C'est l'expérience qui paraît la plus sévère de la série actuelle de 8, mais ce n'est pas elle qui a donné les résultats les plus alarmants ; c'est la précédente.

Sur 9 cobayes exposés ici, 2 sont morts trop tôt : après 1 et 10 jours. Un

troisième est mort le 23 septembre, soit 40 jours après, et il a été trouvé sain. Les 6 derniers ont été sacrifiés le 28 septembre, soit 45 jours après l'inhalation; *parmi eux 3 étaient sains et 3 étaient tuberculeux avec lésions de type respiratoire pur*, consistant en 1, 1 et 2 tubercules pulmonaires primitifs, associés aux adénopathies caséuses habituelles et à des lésions de généralisation au début. Cela fait 3 cobayes tuberculeux sur 7 qui ont vécu un temps suffisant après l'épreuve.

EXPÉRIENCE V. — Même matériel avec 8 cobayes neufs. Seul, le malade Te..., dix-sept ans (106.000 bacilles par milligramme), est employé. Il tousse 130 fois en 56 minutes, ce qui représente environ 78 litres d'air que les cobayes ont inhalé pendant 1 h. 10 minutes; ce malade a la toux forte, quinteuse, des crachats muco-purulents et nummulaires.

Deux cobayes périssent trop tôt, après 1 et 12 jours. Les 6 autres sont sacrifiés le 3 octobre, soit 45 jours après l'inhalation. Sur ce nombre de 6, qui ont vécu un temps suffisant, *3 sont tuberculeux. chacun avec un tubercule pulmonaire primitif*, des adénopathies pulmonaires caséuses et des lésions de généralisation récente.

EXPÉRIENCE VI. — Même manière d'opérer; deux malades toussent successivement. Le premier malade, Cha... (22.500 bacilles par milligramme), tousse 202 fois, par quintes, en 28 minutes; la toux est faible, et tandis qu'elle se produit, on entend l'air « gargouiller » dans les mucosités contenues dans les bronches principales ou la trachée; le crachat est muco-purulent, épais.

Le second malade, Lo... (39.000 bacilles par milligramme de crachats), vient ensuite et tousse 90 fois en 1 heure; ce malade a une moustache sale, et, en outre, une adénite sous-maxillaire. Sa toux est longue, prolongée, quinteuse; c'est un emphysémateux.

Cela fait en tout 292 efforts de toux ayant introduit dans la caisse environ 174 litres d'air que les cobayes ont inhalé pendant 1 h. 50 minutes.

Deux animaux sont morts après 4 et 5 jours; les 6 survivants ont été tués après 45 jours : *un seul cobaye était tuberculeux par inhalation* avec un tubercule pulmonaire primitif et les lésions secondaires habituelles.

EXPÉRIENCE VII. — Mêmes dispositions expérimentales, mais 3 malades toussent successivement. 1<sup>o</sup> Le malade Da..., sujet propre, sans barbe, toux assez forte, crachats muco-purulents, 36.000 bacilles par milligramme; il tousse 62 fois en 37 minutes. 2<sup>o</sup> Le malade Me..., petite moustache, assez propre, tousse par quintes courtes d'une toux forte; crachats nummulaires, 41.000 bacilles par milligramme; il tousse 55 fois en 32 minutes. 3<sup>o</sup> Enfin, le malade Mo..., petite barbe assez propre avec moustache; toux de force moyenne, 32.000 bacilles par milligramme de crachats; ces derniers sont muco-purulents. Le malade tousse 58 fois dans l'appareil en 26 minutes.

Cela fait en tout 175 efforts de toux ayant introduit 403 litres d'air. Les cobayes ont inhalé pendant 1 h. 42 minutes.

Un de ces cobayes est mort après 42 jours et fut reconnu sain; les 7 autres ont été sacrifiés 45 jours après l'inhalation; *ils sont également sains*. Ce résultat est donc entièrement négatif pour 8 cobayes exposés.

EXPÉRIENCE VIII. — Cette dernière expérience a été faite dans les mêmes conditions, mais avec un seul malade, qui est le malade Te..., utilisé pour l'expérience V. En 50 minutes, il tousse 137 fois, ce qui représente environ 82 litres d'air expiré que les cobayes inhalent pendant 1 h. 5 minutes.

Un cobaye périt après 39 jours; *il a de la tuberculose d'inhalation* avec un tubercule pulmonaire primitif. Les 7 autres sont sacrifiés 45 jours après la séance d'inhalation; *sur ce nombre, 4 sont tuberculeux comme le précédent, tous avec des lésions de type respiratoire* et de fortes adénopathies fibro-caséennes des ganglions pulmonaires, et, en outre, avec des lésions récentes de généralisation. En somme, 5 cobayes tuberculeux sur 8 qui ont été exposés à l'inhalation de l'air expiré par ce malade.

EXPÉRIENCE IX. — Exécutée avec la caisse 16 et une malade de dix-neuf ans, Chat..., à la troisième période, en assez bon état général cependant, c'est-à-dire avec un peu d'embonpoint mais légèrement anémique. Cette malade tousse beaucoup et expectore 150 à 200 grammes par jour; crachats muco-purulents, nummulaires; numération : 4.500 bacilles par milligramme de produit.

Immédiatement avant l'expérience, nous lavons au sublimé tiède à 1/1.000 les lèvres, le nez, le menton et les joues de la malade.

De 10 h. 20 à 11 heures, soit en 40 minutes, la malade tousse 215 fois, ce qui correspond à environ 129 litres d'air expulsé dans la caisse. Les cobayes inhalent 15 minutes de plus, soit en tout 35 minutes. Il y avait dans la caisse 10 cobayes dont l'un meurt trop tôt. Les 9 cobayes restants sont sacrifiés 45 jours après l'expérience; *sur ce nombre 3 sont tuberculeux*, avec chacun un tubercule pulmonaire primitif et les adénopathies habituelles, plus des lésions récentes de généralisation qui existent toujours à partir du 35<sup>e</sup> jour environ.

EXPÉRIENCE X. — Exécutée le même jour, dans les mêmes conditions, avec la même malade. Lavage préalable du visage au sublimé à 1/1.000. 10 cobayes sont dans la caisse.

De 14 h. 15 à 15 h. 35, soit en 80 minutes, la malade tousse 316 fois, chiffre qui correspond à environ 189 litres d'air expiré. Les cobayes inhalent en tout pendant 1 h. 35. L'un d'eux périt quelques jours après. Les 9 restants sont sacrifiés 45 jours après l'expérience; *parmi eux il y a 3 tuberculeux* comme dans l'expérience précédente.

EXPÉRIENCE XI. — Faite de la même manière avec le malade Laz..., trente-sept ans, tuberculeux cavitairé, état général assez bon, maigre, avec figure colorée, moustaches, pas de barbe. Lavage de la moustache et des lèvres avec une solution de sublimé. Crachats assez peu purulents, aérés, contenant 6.900 bacilles par milligramme. Le malade tousse et crache modérément. 11 cobayes dans la boîte. En 1 heure le malade tousse 55 fois, par quintes de 4 à 5 efforts expulsifs; la toux est forte et l'air passe bien dans l'appareil. Les cobayes inhalent en tout 1 h. 45.

Sacrifiés 36 jours après la séance d'inhalation, les 11 cobayes sont complètement indemnes.

EXPÉRIENCE XII. — Elle a lieu de la même manière avec un autre malade, Tre..., quarante-deux ans, tuberculeux cavitairé; crachats muco-purulents avec salive, émis en quantité modérée. 10.500 bacilles par milligramme. Petite moustache, pas de barbe; état général : maigre, mais assez coloré. Lavage de la moustache et des lèvres au sublimé tiède. Il y a 11 cobayes dans l'appareil. En 1 h. 30 le malade tousse 83 fois, ce qui correspond à 49 litres d'air environ. En tout les cobayes inhalent 1 h. 35 minutes.

animaux sont sacrifiés 40 jours après l'expérience. *Un seul est tubercu-*

*leux* avec une lésion pulmonaire primitive, des adénopathies caséuses du poumon et de petits tubercules secondaires.

EXPÉRIENCE XIII. — Même matériel. Nous employons un malade, Som..., 45 ans, tuberculeux à la troisième période, toussant et crachant beaucoup : 350 à 400 grammes par jour; crachats muco-purulents, avec peu de salive, 5.000 bacilles par milligramme, peu aérés. État général médiocre, respiration fortement accélérée. Il tousse par quintes de 4 à 10 expirations. Petite moustache et barbe; lavage du visage au sublimé tiède. 11 cobayes dans la caisse.

En 1 h. 5 minutes le malade tousse 204 fois. Les cobayes inhalent 1 h. 15 minutes, c'est-à-dire qu'ils sont retirés de la boîte 10 minutes après que le malade a cessé de tousser.

3 de ces cobayes meurent prématurément.

*Les 8 restants sont sacrifiés 39 jours après l'inhalation et reconnus indemnes*

EXPÉRIENCE XIV. — Mêmes conditions avec un autre malade, L. M..., quarante-six ans, à la même période de la phtisie; tousse et crache assez peu, environ 100 grammes par jour; crachats muco-purulents, 6.500 bacilles par milligramme. Malade propre; petite moustache, barbe rasée. État général assez bon; maigre, mais coloré. 11 cobayes dans la boîte. Lavage du visage au sublimé.

En 1 h. 15 minutes, ce malade tousse 127 fois. Les cobayes inhalent en tout 1 h. 25 minutes. 3 périssent avant le délai suffisant. Les 8 restants sont sacrifiés 39 jours après l'expérience et reconnus indemnes de tuberculose.

EXPÉRIENCE XV. — Même dispositif; la caisse contient 11 cobayes. Lavage des lèvres du malade. Le Co..., quarante-quatre ans; état général passable; moustache et barbe assez propres; il crache 100 à 125 grammes par jour; crachats purée de pois et nummulaires; il tousse par quintes de 2 à 6 toux. Numération : 3.600 bacilles par milligramme. En 1 h. 20 minutes, ce malade tousse 143 fois; les cobayes inhalent en tout 1 h. 30 minutes. 4 d'entre eux périssent en 6 jours. Les 7 survivants sont sacrifiés 39 jours après l'expérience et reconnus sains.

EXPÉRIENCE XVI. — Mêmes conditions. Malade Jour..., quarante-huit ans, état passable; il crache environ 200 grammes; toux forte, par quintes de 2 à 6; crachats muco-purulents, nummulaires. La numération me donne seulement 300 bacilles par milligramme. 11 cobayes dans la caisse; les lèvres du malade sont désinfectées. En 1 h. 20 minutes. Ce malade tousse seulement 52 fois. Les cobayes inhalent 1 h. 30 minutes. L'un d'eux périt le lendemain; les 10 survivants sont sacrifiés 38 jours après l'expérience et reconnus indemnes.

EXPÉRIENCE XVII. — Mêmes conditions. Malade Bou..., quarante-deux ans, ayant eu environ 50 hémoptysies; figure colorée, assez remplie, bien musclé. Emphysémateux. Crachats mousseux, aérés, composés surtout de salive avec un peu de muco-pus. Numération : nous trouvons seulement 80 bacilles par milligramme. 11 cobayes dans la caisse. Les lèvres du malade sont lavées à l'antiseptique plus haut désigné. En 1 h. 10 minutes le malade tousse seulement 56 fois. Les cobayes inhalent 1 h. 15 minutes. 2 d'entre eux meurent trop tôt; les 9 survivants sont sacrifiés après 38 jours et reconnus indemnes de tuberculose.



EXPÉRIENCE XVIII. — Mêmes conditions, avec le malade Leco,..., employé pour l'expérience XV; 12 cobayes sont dans la caisse. Les lèvres du malade sont lavées au sublimé. En 1 h. 30 minutes, ce malade tousse ensuite 72 fois. Les cobayes inhalent en tout pendant 1 h. 35 minutes. 1 d'entre eux périt trop tôt. Les 11 survivants sont sacrifiés après 37 jours et reconnus sains.

\*  
\* \*

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

En résumé nous avons réalisé ici 18 expériences; 8 d'entre elles ont été entièrement négatives et 10 ont donné un nombre variable de résultats positifs.

Le tableau récapitulatif de la page 635 permet d'envisager tous ces résultats.

Dans l'une de ces expériences négatives, 3 malades ont toussé successivement et en tout 175 fois; leurs crachats étaient assez riches en bacilles : 32, 36 et 41.000 par milligramme. Pour les 7 autres expériences négatives, 1 seul malade avait toussé à chaque fois et ses crachats étaient plutôt peu riches en bacilles : de 80 à 7.000 bacilles environ par milligramme; il s'agit là toutefois, chez la plupart des malades, de quantités de bacilles non négligeables : 3 de ces 7 malades ont toussé beaucoup : 127, 143 et 204 fois respectivement. Pour les 4 autres expériences négatives, les malades avaient toussé seulement 52, 53, 56 et 72 fois.

Il y a 10 expériences positives ayant donné des cas d'infection, qui ont varié d'un seul cobaye à la totalité des animaux exposés. Dans une seule expérience (III), effectuée avec 2 malades, qui ont toussé 63 et 67 fois, et dont les crachats contenaient 33.000 et 76.000 bacilles, 8 *cobayes sur 8* ont été tuberculisés. En dehors de l'existence d'une laryngite bacillaire chez le premier, aucun caractère particulier ne distinguait ces malades ou leurs expectorations; leur état général n'était pas particulièrement mauvais. La laryngite bacillaire de l'un d'eux a été observée dans d'autres expériences qui n'ont pas donné le même résultat, si bien que, jusqu'ici, cette localisation ne nous a pas semblé être une condition très aggravante au point de vue de la contagion; enfin, les crachats de ces malades n'étaient pas les plus riches que nous ayons observés dans ces expériences.

La raison de ce résultat très sévère dans cette expérience nous échappe; la pulvérisation bacillaire fine a sans doute été plus abondante que dans toute autre, mais nous ne saurions dire quelle a été la cause de cette abondance.

Une expérience (VIII) faite avec 1 seul malade, Tei..., de dix-sept ans, qui a toussé 137 fois, a donné 5 cobayes tuberculeux sur 8, ce qui est le quantum le plus élevé après le précédent. Ce malade avait des crachats très riches en bacilles : 106.000 par milligramme. Une autre expérience (V), avec le même malade toussant 130 fois, a tuberculisé 3 cobayes sur 6.

Quatre autres expériences (I, IV, IX et X) ont fourni 3 cobayes tuberculeux chacune, sur 7, 7, 9 et 10 animaux exposés dans la caisse. Les 2 premières ont été faites, l'une avec 2 malades qui ont toussé 206 fois (crachats : 46.000 et 69.000 bacilles), l'autre avec 3 malades qui ont toussé 445 fois (crachats : 15.000, 22.000 et 46.000 bacilles); les 2 dernières ont été effectuées avec 1 seul malade, le même pour les 2, ayant toussé 215 et 316 fois, avec crachats contenant seulement 4.500 bacilles par milligramme de produit frais.

Enfin, dans les 3 dernières expériences (II, VI et XII), 1 seul cobaye, sur 7, 6 et 11 survivants, était infecté. Pour les 2 premières, 2 malades dans chacune avaient servi; l'une avec 93 toux au total (23.000 et 48.000 bacilles), l'autre avec 292 toux (22.000 et 39.000 bacilles). La dernière était exécutée avec 1 seul malade qui toussa 83 fois (10.500 bacilles par milligramme de crachats).

Enfin, si nous totalisons les résultats, nous constatons que, pour 152 cobayes exposés, 31, ou 20,39 p. 100, ont été tuberculisés.

Dans de telles proportions, étant données les précautions que nous avons prises (désinfection de la caisse après chaque séance, lavage antiseptique du visage et surtout des lèvres et de la barbe de nos malades), aucun doute n'est possible : il s'agit réellement d'une émission de gouttelettes par le malade. Puisque les lèvres ne vibrent pas pendant la toux, et, d'autre part, puisque la vitesse de l'air est trop faible au-dessus du larynx, les gouttelettes ne peuvent se former qu'en un seul endroit : sur les cordes vocales.

TABLEAU RÉCAPITULATIF DES EXPÉRIENCES  
d'inhalation par le cobaye de l'air expiré par des tuberculeux au moment de la toux.

NUMÉRO des EXPÉRIENCES	NOM DES MALADES (1)	NOMBRE DE BACILLES par milligramme de crachat humide	NOMBRE DE TOUX pendant l'expérience	QUANTITÉ D'AIR introduite DANS LA CAISSE (en comptant 600 c. c. par toux)	DURÉE de L'INHALATION pour les cobayes	COBAYES TUBERCULEUX + et COBAYES RESTÉS SAINS —	NUMÉRE Total des COBAYES
I . .	Mag. Gro.	69.000 46.500	30 } 206 toux. 136 }	30 { 423 litres. 93 }	1 h. 40 m.	+ + + — — —	7
II . .	Ber. Bar.	48.500 23.000	70 } 93 toux. 23 }	42 { 33 litres. 43 }	1 h. 50 m.	+ — — — — —	7
III . .	Cou. Sav.	33.700 76.000	63 } 430 toux. 67 }	37 { 77 litres. 40 }	1 h. 25 m.	+ + + + + +	8
IV . .	Gro. Bou.	46.500 15.000	210 } 445 toux. 70 }	426 { 249 litres. 42 }	1 h. 45 m.	+ + + — — —	7
V . .	Cha. Tel.	22.500 106.000	435 } 430 toux. 202 }	81 { 78 litres. 120 }	1 h. 40 m.	+ + + — — —	6
VI . .	Los. Dag.	92.500 39.000	90 } 292 toux. 62 }	54 { 174 litres. 36 }	1 h. 50 m.	+ — — — — —	6
VII . .	Mer. Mol.	36.000 32.000	55 } 475 toux. 58 }	33 { 103 litres. 34 }	1 h. 42 m.	— — — — — —	8
VIII . .	Tel.	106.000	437 toux.	82 litres.	1 h. 5 m.	+ + + + + +	8
IX . .	Chal.	4.500	245 toux.	429 litres.	55 m.	+ + + — — —	9
X . .	Chal.	1.300	316 toux.	489 litres.	4 h. 35 m.	+ + + — — —	40
XI . .	Laz.	6.900	55 toux.	33 litres.	1 h. 15 m.	+ — — — — —	11
XII . .	Trem.	46.500	83 toux.	49 litres.	1 h. 35 m.	+ — — — — —	14
XIII . .	Som.	5.000	204 toux.	422 litres.	1 h. 15 m.	— — — — — —	9
XIV . .	Lem.	6.500	427 toux.	76 litres.	4 h. 25 m.	— — — — — —	8
XV . .	Lec.	3.600	443 toux.	85 litres.	4 h. 25 m.	— — — — — —	7
XVI . .	Jou.	300	52 toux.	34 litres.	1 h. 30 m.	— — — — — —	40
XVII . .	Cou.	80	56 toux.	33 litres.	1 h. 15 m.	— — — — — —	9
XVIII . .	Lec.	3.600	72 toux.	43 litres.	1 h. 35 m.	— — — — — —	41
					Totaux . .	34 tuberculeux et 421 sains.	152

(4) Tous ces noms sont modifiés.

Remarque : Sur 152 cobayes ayant inhalé, dans ces 48 expériences, 34 sont devenus tuberculeux, soit 20,39 p. 100.

Des recherches que nous avons faites avec H. Magne, et qui sont en cours de publication (1), sur les conditions physiques réalisées dans les voies respiratoires au moment de la toux, il résulte qu'au niveau de la glotte la vitesse de l'air peut atteindre et même dépasser 40 à 48 mètres par seconde et la pression égaler 10 à 11 centimètres de mercure.

D'autre part, dans un premier travail (*Annales de l'Institut Pasteur*, juillet 1914) qui a consisté à faire traverser des crachats bacillaires par un courant aérien de vitesse variable, et à faire inhaler aussitôt cet air par des cobayes, nous avons constaté que la viscosité des crachats s'oppose dans une certaine mesure à leur division en particules fines; pour obtenir, avec les courants aériens, le détachement de particules respirables, il faut atteindre les vitesses de 30 à 35 mètres par seconde. Or nous constatons aujourd'hui, par l'expérience, qu'au niveau du larynx ces vitesses sont atteintes et assez largement dépassées au moment de la toux. Nous devons donc conclure que, *dans le larynx, les conditions physiques nécessaires existent, au moment de la toux, pour la formation de particules respirables aux dépens des mucosités bronchiques*; et nous en fournissons la preuve par trois méthodes : 1° en faisant barboter de l'air dans des crachats, à une vitesse connue; 2° en mesurant, par les méthodes physiologiques, la vitesse de l'air dans la trachée et le larynx; 3° en faisant tousser des malades contagieux dans une boîte métallique contenant des cobayes.

Dans notre deuxième mémoire (*Annales de l'Institut Pasteur*, août 1914), nous basant sur quelques premières évaluations de la vitesse de l'air, dans la trachée, au moment de la toux, nous avons cru que cette vitesse n'était que de 20 à 25 mètres environ, au maximum, pour le larynx, et par conséquent était insuffisante pour réaliser la pulvérisation fine des mucosités bacillaires. L'achèvement de nos recherches à ce sujet nous montre que cette conclusion doit être modifiée, de nouvelles mesures concordantes nous ayant donné la valeur maxima de 40 à 48 mètres par seconde pour la vitesse glottique.

*La possibilité de la contagion par des particules bacillaires*

(1) P. CHAUSSÉ et H. MAGNE, Contribution à l'étude de la toux et de quelques actes expulsifs analogues. Pression et vitesse de l'air. *Archives de médecine expérimentale et d'anatomie pathologique*, n° 3, 1916.



*liquides issues des voies respiratoires du malade, pendant la toux, est donc définitivement établie.*

Il est certain que les gouttelettes ainsi formées sont très fines, puisqu'elles sont immédiatement respirables, étant émises dans un air saturé de vapeur d'eau où elles ne peuvent se dessécher. D'après nos recherches avec les particules colorées cela correspond aux dimensions de 2 à 20 microns environ.

Leur nombre est vraisemblablement peu élevé, ce qui est prouvé par ce fait que nous avons eu un grand nombre de résultats négatifs en essayant de recueillir ces particules et en les inoculant. Nos recherches à ce sujet, par barbotage de l'air dans des crachats et inhalation de cet air, celles qui ont consisté dans la récolte des gouttelettes et la détermination de leurs dimensions, de leur forme et de leur nombre, nos épreuves de toux artificielle, et même les expériences d'inhalation de l'air expiré pendant la toux, faites avec la caisse de 86 litres, dont nous avons parlé au début de ce mémoire, conservent toute leur signification. Le fait que, dans cette nouvelle série de 18 expériences, nous en avons de nouveau 8 qui sont entièrement négatives, tandis que la plupart des expériences positives ne le sont que partiellement, et cela dans des conditions très sévères, ce fait, disons-nous, prouve que les particules liquides formées ne sont pas en nombre considérable. Par la toux des malades on arrive à réaliser l'infection des cobayes, mais en collectant en quelque sorte les gouttelettes dans un réservoir de faible capacité, comme notre caisse 16.

Ces résultats nous démontrent en outre que *tous les malades ne sont pas contagieux au même degré*, ce qui doit être en effet nécessairement. Sont contagieux au maximum, en général, ceux qui crachent et toussent le plus et qui ont le plus grand nombre de bacilles dans leurs expectorations. Peut-être en est-il de même de certains malades atteints de laryngite bacillaire. Toutefois les malades ne présentant qu'un petit nombre de bacilles dans leurs expectorations, quelques centaines par milligramme de crachats, doivent aussi être considérés comme dangereux dans les conditions ordinaires, à cause de la répétition des contacts.

La conclusion pratique capitale qui se dégage de ces nouvelles expériences est qu'à côté de la contagion tuberculeuse par les crachats secs, il existe une contagion par les gouttelettes formées aux dépens de la salive et des crachats et directement inhalées.

Il est difficile de définir exactement la participation de chacune de ces deux sources de tuberculose par voie aérienne. Nous pouvons seulement essayer de l'apprécier par divers arguments tirés de l'ensemble de nos constatations expérimentales sur les deux formes du virus et de leur activité respective.

Avec les crachats desséchés nous avons obtenu l'infection d'une manière constante; nous avons réussi même avec une fraction de milligramme de ce produit naturel.

De plus les résultats ont été positifs dans une très forte proportion avec les mouchoirs des malades et par cohabitation de cobayes et de malades. Dans la cohabitation *nos cobayes ont été plus fortement infectés étant placés à 3 mètres qu'à 0<sup>m</sup>80 ou 1 mètre, ce qui tend à exclure l'infection par des gouttelettes venant directement de la bouche des malades.*

Enfin, les poussières reconnues virulentes ont communiqué d'ordinaire une infection à évolution ralentie, une tuberculose atténuée, qui doit être causée par un virus desséché depuis quelques jours et non par un virus inhalé à l'état frais, avant toute dessiccation.

Par comparaison nous avons vu la difficulté de pulvériser des crachats frais avec des courants d'air de vitesse inférieure à 30 mètres environ par seconde; nous avons échoué en essayant de récolter des particules liquides fines dans des boîtes de Petri placées devant le malade, au moment de la toux; nous n'avons eu que des résultats négatifs avec les épreuves de toux artificielle. Nous avons encore échoué en faisant inhaler au cobaye un air ne contenant qu'une proportion modérée de l'air expiré par des malades pendant la toux. Finalement, nous avons réussi à mettre en évidence la contagion par les particules liquides en faisant tousser les malades dans un petit récipient, de manière que les cobayes inhalent, à

l'état de pureté, l'air venant des voies respiratoires de ces malades; mais encore, dans ces conditions, y a-t-il eu un grand nombre de résultats complètement négatifs (8 sur 18) et un grand nombre de résultats partiellement positifs, à un faible degré le plus souvent (9 sur 10).

A l'égard des deux modes de contagion il faut remarquer que l'homme inhale de 30 à 250 fois plus d'air que nos cobayes, ce qui augmente les chances de contagion pour chacun de ces modes.

Dans la cohabitation avec le tuberculeux, il est exceptionnel que l'on reçoive directement dans le visage l'air de la toux du malade. De plus, lorsque des gouttelettes sont émises, elles sont diluées aussitôt dans un grand volume d'air, ce qui diminue le danger.

Ces gouttelettes se dessèchent instantanément après leur émission, et, si l'air est calme, elles commencent à se déposer pour subir une atténuation progressive qui va jusqu'à la perte de la virulence en une dizaine de jours, car elles sont de faible volume. Après leur dépôt, ces gouttelettes sont donc à prendre en considération en tant que poussières virulentes; le dépôt demande de quelques minutes à quelques heures; la perte de la vitalité exige une dizaine de jours. De cela il résulte que *les gouttelettes bacillaires elles-mêmes, comme facteurs de contagion de la phtisie, jouent la plus grande partie de leur rôle après leur dépôt et sous la forme de poussières sèches, de nouveau mobilisées dans l'atmosphère.*

Lorsque le malade ne prend pas de précautions suffisantes, ce qui est le cas général, ses effets et sa literie sont souillés par une quantité importante de matière virulente. Le brossage des effets, l'agitation des linges, la réfection des lits, opérations dont nous avons démontré le danger considérable, les divers soins du ménage (balayage, époussetage) exposent tous les jours et à tout instant les individus sains à l'infection. Les poussières restent suspendues dans l'air jusqu'à sept heures après leur mobilisation, d'après nos constatations; les courants d'air, les mouvements du malade, lorsqu'il est alité surtout, mobilisent fréquemment ces poussières; autant dire que le danger qui en résulte est permanent, et ce danger est démontré considérable par nos épreuves de cohabitation.

Si donc nous comparons ces divers résultats des deux catégories, nous trouvons qu'ils sont en faveur de la prééminence de la contagion par le virus desséché; mais, au point de vue prophylactique, il faut évidemment agir contre les deux sources possibles de la maladie.

\* \*

Les dernières constatations expérimentales que nous avons faites ici, mettant en évidence la contagion par les gouttelettes, démontrent par cela même que la prophylaxie sera plus difficile qu'à l'égard du virus sec exclusivement. *Non seulement il faut recueillir le crachat dans sa totalité, et le détruire, prendre des précautions à l'égard des linges et tissus souillés de bacilles, du visage et des mains du malade qui sont également plus ou moins pollués, — c'est là la partie de la prophylaxie la plus facile et la plus sûre dans ses effets, — mais il faut d'autre part essayer d'empêcher l'émission de gouttelettes au moment de la toux du malade.*

Or nous ne pouvons empêcher cette émission d'une manière complète, parce que les particules assez fines pour être respirables ne se fixent pas facilement sur les objets rencontrés; elles se réfléchissent pour la plupart avec l'air qui les transporte; nous avons démontré que c'est précisément pour cette raison que lesdites particules sont respirables; en effet, *si elles se fixaient aisément sur un obstacle rencontré, tel un linge placé devant la bouche, elles seraient pareillement arrêtées dans les premières voies respiratoires*, à cause des changements de direction subis par le courant aérien inspiratoire. Tout ce que nous pouvons faire contre elles est donc d'essayer d'en arrêter et fixer une partie, les plus grosses, les moins redoutables pour la contagion immédiate qui exige des particules fines, les plus redoutables pour la contagion éloignée après dépôt et dessiccation. Il faudra donc demander au malade de tousser sur un linge imprégné d'antiseptique, à l'état sec ou humide, de manière à tuer les bacilles fixés par ce linge; celui-ci sera changé fréquemment, au moins tous les jours une fois.

Toutes ces expériences avec le virus sec ou humide, ou par



cohabitation avec le malade, nous démontrent que *la tuberculose est extrêmement contagieuse, et, par conséquent, qu'il est absolument nécessaire d'organiser, d'après les données expérimentales, une prophylaxie rationnelle qui ne peut manquer d'être efficace et d'abaisser rapidement, dans des proportions considérables, la morbidité tuberculeuse humaine.*

**ORIGINE**  
**ET DISTRIBUTION DE L'URÉE DANS LA NATURE**  
**APPLICATION**  
**DE NOUVELLES MÉTHODES D'ANALYSE DE L'URÉE**  
**BASÉES SUR L'EMPLOI DU XANTHYDROL**

par R. FOSSE.

**DEUXIÈME PARTIE**

**L'ALBUMINE ET L'URÉE**

L'azote pénètre dans l'organisme animal à l'état d'albumine, il en sort principalement sous la forme d'urée.

Par suite de l'importance des phénomènes de combustion chez les animaux, on a été naturellement conduit à penser, de prime abord, que *l'urée provient in vivo de l'albumine et que l'oxydation est le phénomène chimique qui lui donne directement naissance.*

C'est par Dumas et Cahours, dès 1842, que le problème de l'origine de l'urée et du mécanisme de sa formation a été envisagé et posé pour la première fois.

Prévost et Dumas (1) démontrent d'abord (1823) que le sang du chien, du chat et du lapin, auxquels on a fait subir l'ablation des reins, contient ce même principe défini que, 50 ans auparavant, Rouelle le jeune avait retiré de l'urine (1773). Ils établissent leur démonstration, non par des réactions plus ou moins caractéristiques de l'urée, mais par l'analyse élémentaire de ce corps, isolé à l'état pur.

Après cette célèbre découverte qui montrait, à l'encontre de l'opinion admise en ce temps-là, que le rein ne produit pas

(1) PRÉVOST et DUMAS, Examen du sang et de son action dans les divers phénomènes de la vie. *Annales de chimie et de physique*, 1823, 2<sup>e</sup> série, t. XXIII, p. 90-104.

l'urée, mais l'élimine, Dumas, avec la collaboration de Cahours (1), publie une importante étude sur « les matières azotées neutres de l'organisme », où il conclut que l'urée *doit se former dans l'économie, grâce à l'oxydation de l'albumine*.

« Abstraction faite des excréments, disent-ils, l'homme adulte absorbe chaque jour une quantité de matière azotée neutre capable de représenter 15 à 16 grammes d'azote, quantité qui se retrouve en entier dans les 30 à 32 grammes d'urée que renferme l'urine qu'il rend dans les 24 heures.

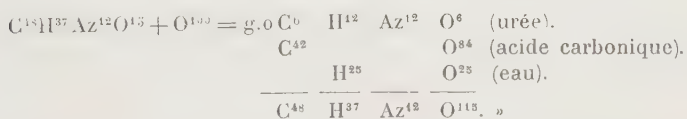
« Ainsi, abstraction faite de tous les phénomènes qui se passent dans l'intérieur des organes, et en ne considérant que la balance d'entrée et de sortie, on trouve que l'homme rend en urée à peu près tout l'azote qu'il avait reçu sous forme de matière azotée neutre.

« N'est-il pas tout simple d'en conclure que la matière azotée neutre de nos aliments sert à produire cette urée et que toute l'industrie de l'organisme animal se borne, soit à assimiler cette matière azotée neutre quand il en a besoin, soit à la convertir en urée ?

« Cette opinion devient presque l'évidence, si l'on ajoute que l'étude des phénomènes de la respiration nous démontre que les matières grasses disparaissent de l'organisme animal par l'effet d'une véritable combustion ; que les matières amylacées ou sucrées sont également brûlées dans l'accomplissement des phénomènes de la vie ; enfin, que la différence qui existe entre l'urée et la matière animale neutre, d'où elle provient, se représente exactement par un phénomène de combustion...

« ...C'est donc, du moins nous l'admettons ainsi, par une véritable combustion que la matière azotée neutre s'est convertie en urée.

« Quand l'albumine ou la caséine se convertissent en urée, elles passent sans doute par divers intermédiaires qui, négligés ici, donnent en définitive



(1) DUMAS et CAHOURS, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 1842, t. XV, p. 976.

## CHAPITRE PREMIER

## LA PRODUCTION ARTIFICIELLE DE L'URÉE

## PAR L'ACTION DE RÉACTIFS OXYDANTS SUR L'ALBUMINE EST-ELLE POSSIBLE?

1. Dumas ne put réussir à confirmer ses prévisions par l'expérience. Les nombreuses tentatives qu'il fit pour réaliser la formation de l'urée en oxydant l'albumine échouèrent complètement.

« J'ai cherché maintes fois, en effet, à diverses époques, à brûler l'albumine, dit-il, et à la brûler sous l'influence d'une liqueur alcaline, par analogie avec ce qui se passe dans le sang, dans l'espoir de la convertir en urée ; j'ai employé à cet effet le bichromate de potasse, l'oxyde de mercure, celui d'argent, l'oxyde puce de plomb avec des liqueurs alcalines, et je n'ai jamais réussi (1). »

2. Antoine Béchamp (2) fut plus heureux. Il annonce dans une Thèse de médecine et dans un extrait de ce travail aux *Annales de chimie et de physique*, que l'oxydation alcaline permanganique de l'albumine conduit à l'urée (1856).

*Quantité de permanganate employé.* — Il trouve par le calcul qu'il faut 152 grammes d'oxygène environ, c'est-à-dire près de 4.000 grammes de permanganate de potassium pour que tout l'azote de 100 grammes d'albumine passe à l'état d'urée. Comme la destruction d'une pareille proportion de réactif oxydant est pratiquement impossible, il n'en prend que les trois quarts de la quantité calculée, 750 grammes au maximum pour 100 grammes d'albumine.

*Mode opératoire.* — 10 grammes d'albumine, en solution dans 30 fois leur poids d'eau, sont additionnés peu à peu de 75 grammes de  $\text{MnO}_4\text{K}$ . Après que la réaction, assez vive au début, s'est calmée, il chauffe à 40° et sature de temps en temps l'alcali libre par de l'acide sulfurique étendu, tout en conservant au milieu une faible réaction alcaline.

(1) DUMAS, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 1856, t. XLIII, p. 548.

(2) A. BÉCHAMP, *Annales de chimie et de physique*, 1856, t. XLVIII, p. 348.



*Extraction et caractérisation de l'urée.* — Après destruction complète du persel, le filtrat, exactement neutralisé, est concentré au bain-marie et le produit traité par l'alcool fort. On sépare par filtration les sulfates de potassium et d'ammonium, évapore et reprend par l'alcool absolu le résidu sirupeux. Le produit résultant de l'évaporation de cette dernière liqueur alcoolique manifeste les réactions de l'urée à l'égard de la potasse, du réactif de Millon, des acides azotique et oxalique, ainsi que du nitrate mercurique avec ou sans addition de potasse.

Pour isoler l'urée, Béchamp traite par l'acide oxalique le produit d'évaporation de la dernière liqueur alcoolique, décompose l'oxalate par le carbonate de baryum, filtre la solution, l'évapore à sec et dissout le résidu dans l'alcool. Des cristaux d'urée se séparent par addition d'éther.

En présentant à l'Académie cette Thèse qui venait si heureusement confirmer ses propres idées théoriques, Dumas (1) ajouta :

« Elle est digne de l'attention du monde savant, non parce qu'elle nous apprend à produire l'urée par un moyen nouveau, ce sont là jeux familiers à la chimie organique, mais parce qu'elle fait connaître l'origine de l'urée dans l'économie animale.

« ...M. Béchamp vient de donner à la théorie chimique de la respiration son dernier et indispensable complément, en prouvant que l'urée dérive de l'albumine ou des produits azotés analogues et que l'albumine peut être directement transformée en urée par une combustion lente, opérée à l'aide d'une dissolution de permanganate de potasse vers la température de 80°.

« M. Béchamp ayant cité divers passages de mes écrits, établissant que l'urée constitue le résidu de la combustion des matières azotées du sang ou des tissus azotés en voie d'élimination, il est de mon devoir d'ajouter à ce qu'il a dit avec tant de bienveillance, que cette opinion, qui m'avait paru si conforme à l'ensemble des données de la physiologie, qui s'était maintenue dans mon esprit d'une manière si persévérante,

(1) DUMAS, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 1856, t. XLIII, p. 548.

avait été cependant l'objet de ma part de beaucoup d'essais infructueux, tentés en vue d'en obtenir la vérification qu'il vient de réaliser d'une manière si brillante...

« ...L'urée où se concentre l'azote, excrété par les animaux, est donc, comme je l'avais annoncé, un produit direct de la respiration, formé dans le sang comme l'acide carbonique, par oxydation lente au moyen de l'oxygène fourni par les poumons. Charriés l'un et l'autre par le sang, ils en sont éliminés l'un à titre de gaz par la surface pulmonaire; l'autre à titre de produit soluble par les reins; l'un pour servir à l'alimentation des plantes par les feuilles, l'autre à leur alimentation par les racines.

« Les matériaux combustibles du sang donnent donc en définitive, comme produits essentiels, de l'acide carbonique, de l'eau et de l'urée, à moins que cette dernière ne soit remplacée par des produits d'une combustion moins avancée. »

3. L'observation de Béchamp est infirmée presque aussitôt par Städeler (1).

4. Neuf ans plus tard Subbolin (2) refuse comme Städeler d'accepter la conclusion de Béchamp.

5. Béchamp (3) reprend alors l'expérience contestée, en modifie le mode opératoire, maintient le résultat annoncé et reconnaît enfin que *l'opération est assez délicate à conduire, puisqu'il lui est arrivé, à lui-même, une fois de ne pas réussir.*

« Dès le principe, dit-il, j'ai constaté que la réaction doit s'accomplir dans des liqueurs alcalines, devant rester alcalines. Si, dans le but de diminuer cette alcalinité, on ajoute trop d'acide sulfurique pour saturer le carbonate de potasse qui se forme, l'urée peut échapper pour deux motifs : soit qu'elle se détruise de la manière que j'ai indiquée, soit qu'elle contracte quelque combinaison qui l'empêche de se dissoudre dans l'alcool ou qui empêche de réaliser l'une de ses réactions caractéristiques, la formation du nitrate d'urée.

« Or je me suis assuré que l'acide oxalique peut être l'un des termes de l'oxydation; par conséquent, si cet acide peut se combiner à l'urée, il est clair que l'oxalate d'urée échappera,

(1) STÄDELER, *Journal für praktische Chemie*, 1857, t. LXXII, p. 251.

(2) SUBBOLIN, *Chemisches Centralblatt*, 1865, p. 503.

(3) BÉCHAMP, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 1870, t. LXX, p. 866.

et que, s'il entre en solution, la liqueur évaporée fournira un résidu sur lequel l'acide nitrique ne produira rien de caractéristique.

« ... Dans mon premier travail, j'ai signalé le fait, qu'outre l'urée se forment des acides qui sont précipités par l'azotate de plomb et par l'azotate de mercure. Si l'on combine l'emploi successif de l'acétate de plomb et celui de l'azotate de mercure, on arrive, comme il va être dit, à isoler plus facilement l'urée. J'ai remarqué enfin qu'il valait mieux ne pas saturer la potasse devenue carbonate; qu'il y avait, en d'autres termes, moins d'inconvénients à faire agir vivement l'hypermanganate sur la matière albuminoïde, qu'à agir lentement en saturant à mesure par l'acide sulfurique. »

*Mode opératoire de la deuxième expérience de Béchamp.* — 10 grammes de matière albuminoïde, pure et sèche, privée de corps gras et de matières sucrées, sont placés dans une vaste fiole avec 200 cent. cubes à 300 cent. cubes d'eau. Après que la matière s'est bien hydratée, on ajoute en une seule fois 60 à 75 grammes de  $\text{MnO}_4\text{K}$  et l'on porte le tout au bain-marie à 80°, en agitant sans cesse. Une vive réaction se déclare et soulève le mélange, puis la coloration disparaît peu à peu.

*Extraction et analyse de l'urée.* — Le filtrat est additionné d'acétate de plomb (sans excès) qui précipite du carbonate et des sels de plomb. La liqueur filtrée est débarrassée du plomb par l'hydrogène sulfuré (sans excès). On filtre et précipite l'urée par addition successive de nitrate mercurique et d'eau de baryte. Après décomposition par  $\text{H}_2\text{S}$  de la combinaison mercurique, lavée et délayée dans un peu d'eau, on filtre, neutralise la liqueur par du carbonate de baryum, filtre et évapore au bain-marie.

Tantôt le résidu cristallise, tantôt il reste visqueux.

*Béchamp ne parvient cependant pas à isoler l'urée pure à l'analyse.* Après avoir analysé par le réactif de Millon le produit de l'évaporation de la solution alcoolique de ce résidu, il dit :

« Ces analyses démontrent deux choses : la première, que l'urée est réellement produite ; la seconde, qu'elle est mêlée dans le résidu avec une autre amide.

« Si les analyses donnent des nombres un peu trop forts pour

*l'azote, c'est que quelque composé amidé se forme. Les cristaux sont toujours souillés, en effet, d'un produit incristallisable qui fournit l'azote en excès. Du reste, le résultat est semblable en dosant l'urée de l'urine par le réactif de Millon.*

6. O. Lœw (1) aboutit toujours à un résultat négatif en répétant soit la première, soit la seconde des expériences de Béchamp.

7. E. Ritter (2) réussit, au contraire, à produire l'urée aux dépens de l'albumine, de la fibrine et du gluten en suivant à la lettre la deuxième expérience de Béchamp.

8. Tappeiner (3) prend parti pour Städeler, Subbotin et Lœw contre Béchamp et Ritter.

9. En oxydant l'albumine par le permanganate de potassium, en milieu à peine alcalin, grâce à la présence de sulfate de magnésium, Lossen (4) n'obtient point trace d'urée, mais de la guanidine, qu'il isole à l'état de pureté et identifie par l'analyse. Il en conclut que Béchamp a eu entre les mains de la guanidine et non de l'urée.

10. La faculté que possède l'économie animale d'éliminer sous forme d'urée soit les acides aminés (Schultzen et Nencki) (5), soit même les sels ammoniacaux (Knieriem) (6) conduisit F. Hofmeister (7) à constater que l'urée apparaît *in vitro* lorsqu'on oxyde en milieu fortement ammoniacal à l'aide de quantités équimoléculaires de permanganate de potassium et de chlorure d'ammonium, à  $+40^{\circ}$  au maximum : les acides aminés, l'albumine et une série de substances, azotées ou non, étrangères à l'économie animale.

11. D'après Jolles (8) la majeure partie de l'azote albuminoïde pourrait être transformée en urée : 70 à 80 p. 100 dans le cas de l'ovalbumine, de la sérumalbumine et de la caséine ; 90 p. 100 en ce qui concerne l'oxyhémoglobine !

(1) LOEW, *Journal für praktische Chemie*, 1870, t. II, p. 289.

(2) RITTER, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 1871, t. LXXIII, p. 1219.

(3) TAPPEINER, *Chemisches Centralblatt*, 1872, p. 21.

(4) LOSSEN, *Journal für praktische Chemie*, 1880, t. CCI, p. 369.

(5) SCHULTZEN et NENCKI, *Berichte*, 1869, t. II, p. 556 ; *Zeitschrift für Biol.*, 1873, t. 8, p. 124 ; — NENCKI, *Berichte*, 1872, 5, p. 890.

(6) KNIERIEM, *Zeitschrift für Biol.*, 1874, t. X, p. 263.

(7) F. HOFMEISTER, *Archiv für experim. Path. und Pharmac.*, 1896, t. XXXVIII, p. 426-444.

(8) JOLLES, *Chemisches Centralblatt*, 1901, II, p. 234.



C'est à l'oxydation par le permanganate de potassium et l'acide sulfurique que l'on serait redevable de ces surprenants résultats.

12. Schulz (1), Falta (2), Abderhalden (3) ont énergiquement protesté contre ces prétendues synthèses de l'urée en milieu sulfurique.

13. Hugounenq (4) isole l'urée, pure et cristallisée, des produits résultants de l'oxydation de l'albumine par le persulfate d'ammonium, en milieu fortement ammoniacal.

14. En dehors de A. Gautier (5) qui estime que « l'observation si souvent contredite de M. Béchamp paraît toutefois exacte », la littérature chimique antérieure à nos premières notes sur l'urée (1912) n'accorde que peu de crédit à la production artificielle de cette amide par l'action de réactifs oxydants sur l'albumine.

La plupart des traités ne citent plus cette réaction.

D'autres expriment l'opinion que cette synthèse n'a jamais été réalisée, paraît douteuse ou n'est pas suffisamment démontrée.

Même oubli ou jugement négatif dans les mémoires sur l'urée.

15. DICTIONNAIRE DE WÜRTZ, suppl. I, p. 56 :

« M. Béchamp avait annoncé que, dans ces conditions, il se formait une trace d'urée et un produit cristallin de nature indéterminée. La formation de l'urée avait été contestée par Städeler. Dans le cours de ces dix dernières années la discussion de ce point a été reprise sans amener la conviction en faveur de l'expérience de Béchamp. »

SCHÜTZENBERGER, *Chimie générale*, t. VI, p. 171 :

« D'après Béchamp et Ritter, il se formerait de l'urée dans cette dernière circonstance ; d'après d'autres recherches, le fait de la production de l'urée par oxydation des albuminoïdes au

(1) SCHULZ, *Ibid.*, 1901, II, p. 856; *Zeitschrift für phys. Chem.*, t. XXXIII, p. 363.

(2) FALTA *Chemisches Centralblatt*, 1901, II, p. 911; *Berichte*, XXXIV, p. 2674.

(3) ABDERHALDEN, *Chemisches Centralblatt*, 1903, I, p. 1218; 1903, II, p. 559; *Zeitschrift für phys. Chem.*, XXXVII, p. 506; XXXIX, p. 210.

(4) HUGOUNENQ, *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 1901, CXXXII, p. 1240.

(5) A. GAUTIER, *Chimie biologique*, 1892, p. 95.

moyen de permanganate de potasse ne serait pas suffisamment établi. »

ARTHUS, *Précis de Physiologie*, 3<sup>e</sup> édition, 1908, p. 492 :

« ...Les chimistes n'ont pas réussi, en partant des protéiques, à faire de l'urée *in vitro*, directement et sans intermédiaire. »

RICHTER et ANSCHÜTZ, *Chimie organique*, t. I, 1909, p. 375 :

« Les dérivés azotés de l'albumine, qui sont éliminés par l'urine, n'ont pu, en général, être obtenus artificiellement aux dépens de l'albumine. »

HAMMARSTEN, *Lehrbuch der physiologischen Chemie*, 7<sup>e</sup> édition, 1910, p. 647 :

« Dans les tentatives d'obtention directe de l'urée par oxydation de l'albumine, on a obtenu quelque peu de guanidine, mais de l'urée, cela n'est pas certain. »

## CHAPITRE II

### DÉMONSTRATION DE LA FORMATION DE L'URÉE DANS L'EXPÉRIENCE DE BÉCHAMP

*Oxydation de l'albumine.* — 5 à 6 grammes de  $\text{MnO}_4\text{K}$  pulvérisés sont introduits dans un vase contenant 100 cent. cubes d'eau et 5 volumes d'albumine pure, coagulée, imbibée d'eau par trempage préalable durant 4-5 heures. Le mélange est plongé dans un bain à 75-80° et agité de temps en temps. La coloration du caméléon ayant disparu, une nouvelle dose est ajoutée et l'opération répétée jusqu'à destruction totale de 35 grammes de permanganate.

*Précipitation de l'urée.* — Après essorage de la mixture à la trompe, lavage du vase et du peroxyde avec 150 cent. cubes d'acide acétique cristallisable, le filtrat incolore est traité par 30 cent. cubes de solution alcoolique de xanthidrol à 1/20. Un trouble se produit, puis un précipité blanc volumineux se sépare, formé de petits cristaux.

*Recristallisation de l'urée brute.* — La matière, essorée après quelques heures, lavée à l'alcool, est dissoute dans la pyridine à l'ébullition au reflux. Elle s'en sépare par refroidissement en cristaux brillants qu'on essore, lave à l'alcool et sèche à 100-110°.

L'analyse complète (1) identifie ce corps à l'urée dioxanthylée



Le même résultat positif a été obtenu en soumettant à la même expérience :

- 1° La globuline de l'œuf,
- 2° L'albumine du sang,
- 3° La fibrine de bœuf et de porc,
- 4° La caséine du lait de vache,
- 5° La gélatine commerciale,
- 6° Le gluten de blé.

Quoique l'urée ait ainsi pris naissance au sein d'un mélange oxydant, il n'en faudrait cependant pas conclure *a priori* que sa formation est due *nécessairement et exclusivement* à un *procès d'oxydation*.

Les travaux de Schützenberger, Schulze et Steiger, Drechsel, Kossel, Richet, Kossel et Dakin, A. Gautier nous ont conduit à penser que ce corps devait aussi se produire *directement* par l'action des alcalis sur l'albumine.

L'expérience a vérifié cette prévision et nous a ainsi mis en possession, à la fois, d'un mode de formation de l'urée, qui n'avait pas encore été réalisé directement *sous l'influence unique des alcalis* et d'une réaction générale, caractéristique et sensible des matières protéiques.

### CHAPITRE III

#### PRODUCTION DIRECTE DE L'URÉE PAR HYDROLYSE ALCALINE DES ALBUMINOIDES

1. D'après Schützenberger les matières protéiques dérivent de deux amides :

l'urée  $\text{NH}^2 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}^2$

et

l'oxamide  $\text{NH}^2 \cdot \text{CO} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}^2$

Pour émettre cette hypothèse, l'éminent chimiste s'appuie,

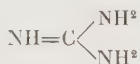
(1) Le registre de laboratoire concernant les analyses de ce corps se trouvant actuellement à Lille, nous ne pouvons transcrire ici les chiffres donnés par la combustion et le dosage de l'azote.

non pas sur la formation et l'isolement des deux diamides, mais uniquement sur le rapport des gaz carbonique et ammoniac, engendrés par l'action de la baryte sur les protéiques, à une température où l'urée et l'oxamide sont complètement hydrolysées.

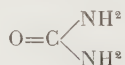
La conception de Schützenberger, considérant les albuminoïdes comme des dérivés de l'urée, a été à la fois confirmée et rectifiée. Dans l'état actuel de nos connaissances, les protéiques dérivent moins directement de l'urée que de la guanidine.

En soumettant l'albumine à l'action hydrolysante des acides minéraux, Drechsel (1) a isolé une substance qui, sous l'influence de l'eau de baryte à l'ébullition, se scinde en urée et un autre corps azoté.

On sait aujourd'hui qu'il existe dans la molécule des protéiques un groupement générateur de l'urée, celui de la guanidine



qui n'est autre chose que l'imide de l'urée :



Le noyau guanidique fait partie intégrante d'un acide aminé, l'arginine, produit constant de l'hydrolyse des albuminoïdes par les acides minéraux.

L'arginine ou acide δ-guanidyl α-aminopentanoïque



découverte par Schulze et Steiger (2) dans les pousses de lupin et de courge étiolées, se produit synthétiquement par condensation de la cyanamide et de l'ornithine (Schulze et Winterstein) [3].

(1) DRECHSEL, *Berichte*, 1890, t. XXIII, p. 3096.

(2) SCHULZE et STEIGER, *Berichte*, 1886, t. XIX, p. 1177; — *Zeitsch. für physiol. Ch.*, t. II, p. 43; t. XXIX, p. 329; t. XLI, p. 458; t. XLIII, p. 179.

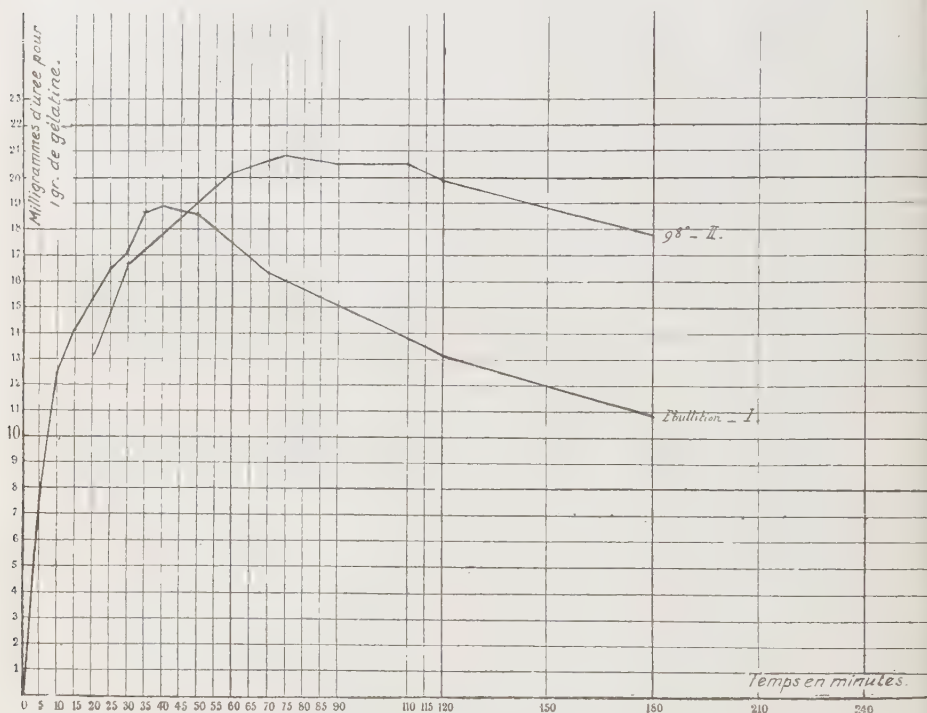
(3) SCHULZE et WINTERSTEIN, *Berichte*, 1899, t. XXXII, p. 3191; — *Zeitsch. für physiol. Ch.*, 1901, t. XXXIV, p. 128.





Fibrine de porc,  
Caséine du lait de vache,  
Gélatine,  
Peptone de Witte.

3. La baryte, les carbonates de potassium et de sodium se comportent à l'ébullition comme la potasse et la soude, mais avec plus de lenteur.



A la température ordinaire, les alcalis caustiques dégradent lentement les protéiques en urée.

Cette transformation peut être obtenue encore, même par la chaux caustique pure en suspension dans l'eau, après 5 heures d'ébullition.

A 100°, avec l'eau pure ou acétifiée, le résultat est négatif.

4. Afin de déterminer l'influence de la durée du chauffage sur la quantité de carbamide formée par un poids donné de gélatine et de potasse, nous avons institué deux séries d'expériences :

Dans l'une, 50 cent. cubes de solution de gélatine et de potasse à 1/10, préparée à froid, ont été maintenus à l'ébullition au reflux durant des temps variables (courbe I), ci-contre.

Dans l'autre (courbe II), on a placé, pendant des intervalles de temps croissants, à  $+98^{\circ}$ , 10 cent. cubes de liqueur titrée contenant 1/10 de gélatine et 1/20 de potasse.

Les courbes qui figurent ici résument les résultats obtenus, rapportés à 1 gramme de gélatine, l'urée étant évaluée en milligrammes et le temps en minutes.

*On voit que la quantité d'urée formée augmente d'abord très rapidement, atteint un maximum et diminue ensuite avec une extrême lenteur.*

*L'urée obtenue dans la première phase du phénomène résulte donc de deux actions de sens opposés et de vitesses très différentes, provoquées par une même cause, l'hydrolyse alcaline, s'exerçant sur deux corps de résistances fort inégales : un dérivé guanidique (la molécule protéique) et l'urée.*

*Tandis que la réaction génératrice de l'urée a terminé sa tâche en 40 minutes environ (courbe I), la réaction destructive ne réussit pas, même après 3 heures, à accomplir la moitié de la sienne.*

## CHAPITRE IV

### LE PROCESSUS PUR ET SIMPLE DE L'OXYDATION PEUT-IL RÉALISER LA SYNTHÈSE DE L'URÉE AUX DÉPENS DES PROTÉIQUES ?

L'albumine produit donc indiscutablement l'urée sous l'influence : soit du permanganate de potasse, soit seulement de la potasse, de la soude ou de leurs carbonates.

Ce sont là, ainsi qu'on vient de le voir, transformations faciles à vérifier grâce au xanthhydrol.

Si la nouvelle méthode d'identification de l'urée, appliquée à la réaction de Béchamp, permet de trancher *définitivement* une des questions les plus discutées de la littérature chimique, elle ne nous apprend rien cependant sur le mécanisme qui donne naissance à ce corps.

L'urée, formée dans cette expérience, provient-elle uniquement de l'hydrolyse du noyau guanidique de l'albumine ?

Découle-t-elle à la fois de cette origine et de l'oxydation de groupements non uréogènes de la molécule protéique?

Dans quelle mesure ces deux sources collaborent-elles à la formation de l'urée?

Ces questions, qui paraissent *a priori* fort difficiles à résoudre, s'éclairent d'une vive lumière par le dosage de l'urée dans les produits résultant de l'oxydation d'un albuminoïde donné et celui de l'arginine dans le même protéique.

Voici un tableau de la teneur en arginine de plusieurs protéiques, déterminée par différents auteurs.

Teneur en arginine et urée virtuelle de quelques protéiques.

PROTEIQUE	ARGININE pour 100	AUTEURS	URÉE VIRTUELLE pour 100
<b>1<sup>o</sup> Protamines.</b>			
Salmine. . . . .	87,4	Kossel et Kutscher . . . .	30,1
Clupéine . . . . .	82,2	Kossel et Dakin. . . . .	28,3
Stucine . . . . .	58,2	Id. . . . .	20,
<b>2<sup>o</sup> Protéiques d'origine animale.</b>			
Albumine de l'œuf cristallisée . . . . .	2,14	Hugounenq et Galimard . .	0,74
Albumine du jaune d'œuf. . . . .	2,39	Chapman et Petrie . . . .	0,82
Vitelline du jaune d'œuf. . . . .	7,46	Osborne et Yones, . . . .	2,57
Albumine de chair de poulet. . . . .	6,5	Osborne et Heyl. . . . .	2,24
Albumine musculaire de la chair de poisson . . . . .	6,34	Id. . . . .	2,18
Fibrine . . . . .	3,	Kutscher. . . . .	
	Ensemble avec l'histidine.		
Caséine . . . . .	4,84	Hart. . . . .	1,66
<b>3<sup>o</sup> Albumoïdes.</b>			
Gélatine. . . . .	9,3	Kossel et Kutscher . . . .	3,2
Fibroïne (soie) . . . . .	4,	E. Fischer et Skita . . . .	0,34
Séricine (soie) . . . . .	4,	Id. . . . .	1,37
Elastine. . . . .	0,3	Kossel et Kutscher . . . .	0,1
Kératine (mouton). . . . .	2,7	Abderhalden et Voilnovici.	0,93
<b>4<sup>o</sup> Albuminoïdes d'origine végétale.</b>			
Gluten (blé). . . . .	3,05	Kossel et Kutscher . . . .	1,05
Mucédine (blé) . . . . .	3,13	Id. . . . .	1,07
Glyadine (blé) . . . . .	3,40	Abderhalden et Samulz . .	1,17
Zéine (maïs) . . . . .	1,82	Osborne et Yones. . . . .	0,62
Légumine (vesce). . . . .	11,06	Osborne et Heyl. . . . .	3,8
Conglutine (lupin). . . . .	10,93	Osborne, Leavenworth et Brautecht . . . . .	3,77
Globuline (semence de courge) . . . . .	14,4	Osborne et Clapp . . . . .	4,9



Dans la quatrième colonne, nous avons calculé, en lui attribuant le qualificatif de *virtuelle*, l'urée correspondant à l'arginine.

On voit que l'*urée virtuelle*, variable d'un protéique à l'autre, atteint des valeurs très élevées chez les protamines pour s'abaisser considérablement, au contraire, dans le cas des albuminoïdes que nous consommons.

Quelle est, dans l'urée totale que nous rejetons, la part de l'urée *virtuelle* de nos aliments?

D'après Drechsel, si la totalité de l'arginine, incluse dans les ingesta, était hydrolysée sous l'influence d'un ferment, l'arginase de Kossel, par exemple, l'urée ainsi formée atteindrait à peine 10 p. 100 de la quantité éliminée.

La quantité d'urée obtenue en oxydant un protéique déterminé est-elle supérieure à son urée virtuelle : nous sommes, alors, en droit de conclure à la synthèse de l'urée par oxydation

#### OXYDATION DE LA FIBRINE.

##### A

##### PROPORTION DES COMPOSANTS DE LA RÉACTION.

Fibrine de porc, dégraissée. . . . .	1 gramme.
Eau. . . . .	10 cent. cubes.
MnO <sup>4</sup> K . . . . .	7 gr. 5

*Mode opératoire.* — Au mélange d'eau et de fibrine, abandonné plusieurs heures à la température ordinaire pour permettre l'imbibition et le gonflement de la matière, puis placé au bain-marie vers 70-80°, on ajoute un peu de permanganate et on agite. La fibrine se désagrége en même temps que l'oxydant se détruit. La totalité du permanganate ayant été introduite, le mélange, trituré de temps en temps, avec une baguette de verre, additionné d'eau pour remplacer celle qui s'évapore, est maintenu vers 80°, jusqu'à destruction complète du réactif oxydant. Ce résultat est atteint après 6-7 heures environ.

*Dosage de l'urée.* — La mixture, étendue d'un peu d'eau, est essorée et le résidu lavé à la trompe de manière à produire un volume de liqueur égal à 50 cent. cubes.

20 cent. cubes de cette solution reçoivent 40 cent. cubes

d'acide acétique et 3 cent. cubes de xanthidrol méthylique à 1/10.

Poids d'urée, essorée après 12 heures, lavée à l'alcool et séchée :

0 gr. 067

0 gr. 066

D'où, urée pour 100 grammes de fibrine :

$$\frac{0,067}{7} \times 2,5 \times 100 = 2,39$$

$$\frac{0,066}{7} \times 2,5 \times 100 = 2,36$$

B. — L'expérience qui suit est encore plus conforme aux indications de Béchamp, pour l'oxydation du blanc d'œuf.

L'agitation continuelle qu'il imprimait à la masse a été produite ici mécaniquement au moyen d'un agitateur à palettes, mû électriquement.

PROPORTION DES COMPOSANTS DE LA RÉACTION.

Fibrine. . . . .	10 grammes.
Eau . . . . .	200 cent. cubes.
MnO <sup>4</sup> K. . . . .	75 grammes.

*Mode opératoire.* — Après 3 heures de contact, le mélange d'eau et de fibrine est pourvu d'un seul coup de la totalité du permanganate, placé au bain-marie à 80° et soumis à une agitation mécanique énergique. Après 5 heures environ, tout le permanganate a disparu.

*Dosage de l'urée.* — Volume du filtrat et des eaux de lavage : 500 cent. cubes.

Poids d'urée pour 20 cent. cubes :

0 gr. 067

0 gr. 0665

Trouvé, urée pour 100 grammes de fibrine :

2 gr. 39

2 gr. 36

L'urée virtuelle pour 100 grammes de fibrine est inférieure à 1 gr. 03, puisque l'arginine, dosée en bloc avec l'histidine, a donné le nombre 3. *Il en résulte donc que l'urée créée par oxydation est au moins supérieure à 1 gr. 3 pour 100 de fibrine.*

## OXYDATION DE LA CASÉINE.

## PROPORTION DES COMPOSANTS DE LA RÉACTION.

Caséine du lait de vache . . . . .	1 gramme.
Eau . . . . .	20 cent. cubes.
MnO <sup>4</sup> K. . . . .	7 gr. 5

*Mode opératoire.* -- Au mélange d'eau et de caséine, préparé depuis quelques heures, on ajoute une partie du permanganate, agite et chauffe quelques instants au bain-marie. Après disparition du persel, on répète la même opération deux ou trois fois, puis on place le vase, muni de ce qui reste de permanganate et d'un tube réfrigérant, dans un bain d'eau maintenu à +80°. On agite de temps en temps. Après 3 h. 30 environ, la mixture ne possédait plus de coloration violette.

*Dosage de l'urée.* — Volume du filtrat et des eaux de lavage : 100 cent. cubes.

## A

Uréine produite par 20 cent. cubes :

0 gr. 044  
0 gr. 045

D'où, pour 100 grammes de caséine :

Urée, 3 gr. 14 et 3 gr. 21 ; moyenne . . . . .	3 gr. 17
Urée virtuelle . . . . .	1 gr. 66
Urée formée synthétiquement par oxydation . . . .	1 gr. 51

B. — Même expérience.

Durée du chauffage au bain-marie à +80° : 3 h. 30.

Volume du filtrat et des eaux de lavage : 100 cent. cubes.

Uréine produite par 20 cent. cubes : 0 gr. 04.

D'où, pour 100 grammes de caséine :

Urée totale . . . . .	2 gr. 86
Urée virtuelle . . . . .	1 gr. 66
Urée produite par oxydation . . . . .	1 gr. 20

*Conclusions :*

1° L'action du permanganate de potassium sur l'albumine donne naissance à l'urée ainsi que l'ont annoncé Béchamp d'abord, Ritter ensuite.

2° Mais l'urée se forme aussi directement quand on soumet les matières protéiques à l'action des alcalis caustiques fixes, de leurs carbonates et des terres alcalines, par suite de l'hydrolyse de leur noyau guanidique.

3° La fibrine et la caséine, traitées par la méthode de Béchamp, produisent une quantité d'urée deux fois supérieure environ à l'urée virtuelle, correspondant à la quantité connue d'arginine incluse dans leur molécule.

4° Le phénomène chimique de l'oxydation, pure et simple, permet de réaliser la synthèse de l'urée aux dépens des protéiques, si, les titres en arginine attribués à la fibrine et à la caséine étant exacts, les deux protéiques ne possèdent pas, en outre, d'autres groupes uréogènes inconnus, susceptibles de former, par hydrolyse, une quantité d'urée supérieure à celle qu'ils contiennent déjà virtuellement.

## TROISIÈME PARTIE

### SYNTHÈSE DE L'URÉE PAR OXYDATION DE L'AMMONIAQUE ET DES HYDRATES DE CARBONE OU DE LA GLYCÉRINE PARTICIPATION VRAISEMBLABLE DES HYDRATES DE CARBONE ET DES GRAISSES AU PHÉNOMÈNE DE L'URÉOGENÈSE

#### CHAPITRE PREMIER

1. Nous venons de voir que, sous des réserves plus ou moins fondées, les albuminoïdes donnent synthétiquement naissance à l'urée par oxydation artificielle.

Il est donc possible que le même phénomène ait lieu dans l'organisme et qu'une certaine proportion de l'urée éliminée soit créée directement aux dépens de l'albumine, grâce à un pur phénomène d'oxydation.

*Au point de vue quantitatif, la proportion de l'azote albuminoïde, ainsi transformée artificiellement en urée, est assez faible.*

En effet la caséine oxydée d'après la méthode décrite, nous a donné 3 gr. 2 d'urée pour 100.



Or l'urée virtuelle contenue dans 100 grammes de caséine est représentée par 1 gr. 66.

L'urée formée synthétiquement par oxydation, pour 100 gr. de caséine, égale donc 1 gr. 54.

Le rapport de l'azote de l'urée, ainsi engendrée par oxydation, à 100 parties d'azote total de la caséine, devient, en prenant 15 gr. 7 pour teneur centésimale azotée de ce protéique :

$$1,54 \times \frac{28}{60} \times \frac{1}{15,1} \times 100 = 4 \text{ gr. } 57.$$

Ce rapport accuse une valeur double si, au lieu de considérer uniquement l'urée d'oxydation, on prend l'urée totale (d'hydrolyse et de synthèse), isolée dans l'action du permanganate :

$$3,2 \times \frac{28}{60} \times \frac{1}{1,57} \times 100 = 9 \text{ gr. } 51.$$

On voit donc combien nous sommes encore loin de ce qui se passe dans l'organisme, où 80 à 85 p. 100 de l'azote protéique ingéré s'éliminent à l'état d'urée !

La majeure partie de l'azote mis en expérience échappe à l'uréification : soit qu'il se dégage à l'état d'ammoniaque, soit qu'il s'oxyde en formant de l'acide nitrique, soit encore, et surtout, parce *que l'oxydation manque d'intensité pour brûler le carbone et l'hydrogène* ou, ce qui revient au même, soit que les produits organiques qui dérivent de l'albumine, dans les conditions de l'expérience, *opposent une trop grande résistance au procédé de combustion employé*; soit qu'une partie plus ou moins importante de l'urée formée se détruise par hydrolyse ou oxydation, soit pour d'autres raisons.

Avant d'entreprendre sur l'albumine de nouvelles expériences ayant pour but d'améliorer le rendement en urée et de voir ainsi jusqu'à quel degré il nous était permis d'imiter la nature vivante, nous avons cru devoir examiner si les matériaux carbonés de l'organisme, autres que les protéiques, les *hydrates de carbone* et les *graisses* ne seraient pas capables de produire artificiellement de l'urée par oxydation en *présence d'ammoniaque*.

Cette base peut être considérée comme un produit d'oxydation des protéiques.

L'ammoniaque se forme, en effet, à côté d'acide azotique dans l'oxydation permanganique de l'albumine.

Tout l'azote protéique se métamorphose exclusivement en ammoniacque, tandis que le carbone et l'hydrogène passent à l'état de  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  dans l'oxydation sulfurique, utilisée pour le dosage de l'azote d'après la méthode classique de Kjeldahl.

On trouve cette base dans tous les organes et tous les liquides de l'économie. Elle représente dans l'urine humaine 5 à 6 p. 100 de l'azote total.

Le glucose, présent dans toutes les cellules, est, de tous les principes carbonés, celui que nous consommons le plus abondamment.

Pour fixer les idées, voici ce que dépense en moyenne, par 24 heures, un adulte normal fournissant un travail modéré, d'après Voigt :

Hydrates de carbone. . . . .	500 grammes.
Albumine. . . . .	118 —
Graisses . . . . .	56 —

Aucune relation n'était connue, avant nos travaux entre ces trois constituants normaux qui se forment incessamment dans le sang et toutes les cellules : *glucose, ammoniacque, urée*.

*La littérature affirmait même que l'oxydation artificielle du glucose et de l'ammoniacque ne donne pas trace d'urée.*

Dans le mémoire déjà cité de F. Hofmeister (1), nous relevons, en effet, parmi les substances que l'oxydation permanganique en présence d'ammoniacque n'a pu transformer en urée : le *glucose*, la *glycérine*, l'*aldéhyde formique*.

Il est cependant facile de démontrer :

1° Que l'urée se forme *abondamment* quand on oxyde en présence d'ammoniacque : le *glucose*, le lévulose, la saccharose, la dextrine, l'inuline, l'amidon, la *cellulose* elle-même ; la *glycérine*, constituant des graisses ; l'*aldéhyde formique*, générateur des hydrates de carbone chez les végétaux, d'après la théorie de Baeyer et les synthèses d'Emil Fischer.

2° Que la quantité d'urée, donnée par l'oxydation du glucose et de l'ammoniacque, surpasse de beaucoup celle obtenue dans l'oxydation des protéiques.

(1) F. HOFMEISTER, *Archiv für experim. Path. und Pharm.*, 1896, XXXVII, p. 426.

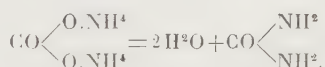
3° Que l'urée se produit encore par oxydation du glucose en présence de très *petites quantités d'ammoniaque*.

4° Qu'elle se forme également aux dépens de ces deux corps, pris à des concentrations du même ordre de grandeur ou même plus faibles que celles que l'on rencontre dans l'organisme.

Il est donc possible que les trois classes de matériaux carbonés contenus chez les êtres vivants (*protéiques, hydrates de carbone et graisses*) participent *in vivo* à l'uréogénèse. Une importante relation, demeurée jusqu'ici complètement inconnue, existe vraisemblablement entre la glycogénèse et l'uréogénèse.

De là découle en outre, sur le mécanisme chimique de cette dernière fonction biologique, des données nouvelles, incompatibles avec la théorie actuellement régnante.

On admet, en effet, que la formation de l'urée dans l'organisme serait due à une diastase, qui déshydraterait le carbonate d'ammoniaque, produit ultime des combustions, caustique et toxique, afin de le métamorphoser en un corps neutre et inoffensif :



L'uréification représenterait donc, chez les animaux, une fonction très particulière, créée dans un but de défense antitoxique, exécutée par de mystérieux agents dont la vie animale aurait le privilège.

Cette diastase uréopoïétique, dont l'existence est encore à démontrer, produirait en milieux aqueux, à 40° au maximum, avec des rendements extrêmement élevés, une *déshydratation* qui n'a pu être réalisée que d'une manière très limitée, à l'autoclave, sous pression, à 120° et en partant du carbonate d'ammoniaque, non dissous, solide.

Si le carbonate d'ammoniaque, corps minéral, devenait de l'urée, corps organique, on assisterait chez l'animal à une véritable synthèse, avec absorption de chaleur, comparable jusqu'à un certain point à celles qui servent de base à la vie végétale, et cela uniquement dans le but de lutter contre la toxicité de l'ammoniaque.

Enfin, d'après la théorie actuelle de l'uréogénèse, les phé-

nomènes d'oxydation n'auraient qu'un rôle tout à fait secondaire, celui de fournir l'acide carbonique nécessaire à la formation du carbonate d'ammonium.

Dans les expériences qui suivent, on voit que l'urée prend naissance, au contraire, par *processus d'oxydation*, à l'abri de toute intervention vitale et en *quantité notable*, quand on oxyde énergiquement, en présence d'ammoniaque, *ceux des aliments que nous consommons le plus abondamment, les hydrates de carbone* (1).

## CHAPITRE II

### OXYDATION DES HYDRATES DE CARBONE OU DE LA GLYCÉRINE EN PRÉSENCE D'AMMONIAQUE

#### OXYDATION DU GLUCOSE ET DE SON POIDS D'AMMONIAQUE PAR LE PERMANGANATE DE POTASSIUM.

##### PROPORTION DES RÉACTIFS.

Glucose pur. . . . .	1 gramme.
Ammoniaque à l'état de sulfate. . . . .	0 gr. 98
Eau . . . . .	20 cent. cubes.
MnO <sup>4</sup> K . . . . .	9 grammes.

*Mode opératoire.* — Dans une fiole conique contenant le glucose, le sel ammoniacal et l'eau, on introduit, par petites portions, dans l'espace de 1 heure et en agitant, le permanganate pulvérisé. Le vase, muni d'un tube réfrigérant, est placé ensuite au bain d'eau chauffé à 50-60°, jusqu'à destruction complète du réactif oxydant.

Lorsque ce résultat est atteint (après 4 heures environ), le mélange refroidi est traité par 30 cent. cubes d'acide acétique cristallisable, puis essoré. Après lavage de la fiole et du peroxyde à l'aide de 20 cent. cubes d'acide acétique, le filtrat incolore, passé à travers un filtre à sulfate de baryte, reçoit 20 cent. cubes de solution alcoolique de xanthidrol à 1/20. Le précipité produit après 12 heures est essoré, lavé à l'alcool, à l'eau

(1) La formation de l'urée en solution, aux dépens du carbonate d'ammoniaque dissous, est endothermique, comme celle des amides en général et absorbe, suivant la dilution, de 6 calories 4 à 8 calories. (BERTHELOT, *Chaleur animale*, 1899, t. I, p. 113.)



chaude, séché et pesé. L'analyse identifie ce corps à l'urée dioxanthylée.

*Rendements.* — Poids d'urée : 0 gr. 5135.

D'où :

Urée pour 100 grammes de glucose . . . . .	7 gr. 33
Urée pour 100 grammes d'ammoniaque . . . . .	7 gr. 78

#### OXYDATION DU GLUCOSE

EN PRÉSENCE DE LA MOITIÉ (ENVIRON) DE SON POIDS D'AMMONIAQUE.

##### PROPORTION DES RÉACTIFS.

Glucose pur . . . . .	1 gramme.
Ammoniaque à l'état de sulfate . . . . .	0 gr. 49
Eau . . . . .	20 cent. cubes.
MnO <sup>+</sup> K . . . . .	9 grammes.

*Même mode opératoire que ci-dessus.*

*Rendements.* — Poids d'urée : 0 gr. 309.

D'où :

Urée pour 100 grammes de glucose . . . . .	4 gr. 41
Urée pour 100 grammes d'ammoniaque . . . . .	9 grammes.

#### OXYDATION DU SUCRE DE CANNE ET DE L'AMMONIAQUE

PAR LE PERMANGANATE CALCIQUE.

##### COMPOSITION DU MILIEU RÉACTIONNEL

Sucre de canne . . . . .	2 grammes.
Ammoniaque . . . . .	2 grammes.
Eau . . . . .	50 cent. cubes.
Permanganate calcique cristallisé . . . . .	20 grammes.

*Mode opératoire.* — Dans un ballon, muni d'un réfrigérant et d'une ampoule à robinet, contenant 20 cent. cubes de solution de sucre et d'ammoniaque à 1/10, on introduit en plusieurs fois, et en agitant, le permanganate dissous dans son poids d'eau. Après lavage de l'ampoule à l'aide de 10 cent. cubes d'eau, on porte à l'ébullition qu'on maintient jusqu'à décoloration complète du mélange. La mixture, pourvue de 50 cent. cubes d'eau, est essorée et le peroxyde lavé avec la même quantité d'eau chaude.

*Volume du filtrat :* 150 cent. cubes.

*Dosage de l'urée.* — Poids d'urée, obtenue en traitant 20 cent. cubes de liqueur par 40 cent. cubes d'acide acétique et 0 gr. 30 de xanthidrol dissous dans l'acide acétique : 0 gr. 0935.

Urée, pour 100 de sucre :

$$\frac{0,0935 \times 150}{7 \times 20} \times 50 = 5 \text{ grammes.}$$

### CHAPITRE III

#### FORMATION DE L'URÉE PAR OXYDATION DE GLUCOSE EN PRÉSENCE DE PETITES QUANTITÉS D'AMMONIAQUE

Nous venons de montrer l'aptitude du glucose et de l'ammoniaque à engendrer l'urée par oxydation.

Mais ces expériences, dans lesquelles nous oxydons le glucose et son poids ou la moitié de son poids d'ammoniaque, s'écartent beaucoup de ce qui se passe dans l'organisme où la quantité d'ammoniaque produite dans un temps donné est bien plus faible que celle de glucose.

D'après Voigt, un homme normal de 75 kilogrammes fournissant un travail modéré, consommerait en moyenne par 24 heures :

Albumine. . . . .	418 grammes.
Graisse. . . . .	56 —
Hydrate de carbone . . . . .	500 —
Calories . . . . .	2.810 —

Si l'on admet que 100 grammes d'albumine possèdent une teneur moyenne de 16 grammes en azote et que tout cet azote passe transitoirement à l'état d'ammoniaque, on trouve pour la production journalière intermédiaire d'ammoniaque en moyenne : 22 gr. 92.

A 500 grammes d'hydrate de carbone correspondraient donc seulement 23 grammes d'ammoniaque environ, c'est-à-dire une quantité d'ammoniaque 22 fois plus faible environ, en admettant, ce qui n'est nullement établi d'ailleurs, que tout l'azote protéique passe par cet état transitoire.

Il est facile de démontrer que de *très petites quantités d'ammoniaque* peuvent être transformées en urée par oxydation en présence de quantités beaucoup plus fortes de glucose.

*Formation de l'urée par oxydation du glucose en présence de 2,4 centigrammes d'ammoniaque (1).*

Cette expérience, dont la durée n'atteint pas 10 minutes, peut être aisément reproduite même dans un cours.

Un tube à essais contenant 0 gr. 17 de  $\text{MnO}\cdot\text{K}$  pulvérisé, reçoit rapidement 3 cent. cubes d'une liqueur titrée renfermant :

Glucose . . . . .	0 gr. 10
Ammoniaque pure . . . . .	0 gr. 024

Le mélange, fortement agité, s'échauffe et se solidifie en une masse brune.

Après addition de 2 cent. cubes d'eau, ébullition (quelques secondes) jusqu'à décoloration complète, on essore sur entonnoir à succion et lave le dépôt à l'aide de 2 cent. cubes d'eau. Du filtrat, traité par 4 cent. cubes d'acide acétique et 1 cent. cube de liqueur alcoolique de xanthidrol à 1/20, se séparent, en moins de 2 minutes, des flocons blancs d'urée xanthylée cristallisée.

*Formation de l'urée par oxydation du glucose et de 1 centigramme d'ammoniaque.*

A. — Dans un tube à essais, de 1 centimètre de diamètre environ, contenant :

$\text{MnO}\cdot\text{K}$ pur et pulvérisé . . . . .	0 gr. 7
--	---------

on introduit successivement :

Liqueur titrée d'ammoniaque (1 c.c. = 0,00994) .	1 cent. cube.
Solution de glucose pur à 1/10. . . . .	1 cent. cube.

On secoue énergiquement le tube dans un plan vertical, pendant qu'une réaction violente et un dégagement intense de chaleur se produisent.

La mixture, pourvue de 2 cent. cubes d'eau, vigoureusement agitée, est portée quelques instants à l'ébullition. Après trituration avec une baguette de verre, chauffage et vérification qu'une parcelle du mélange, placée sur du papier humecté d'eau, ne lui communique plus de coloration violette, on intro-

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des Sciences*, 1912, t. CLIV, p. 1449.

duit dans le tube de l'acide acétique cristallisable (4 cent. cubes), agite et filtre.

Une portion de cette liqueur incolore, traitée par un peu de xanthidrol, dissous dans quelques gouttes d'acide acétique, se trouble en moins de 2 minutes, pour laisser apparaître de petits cristaux brillants, formés de filaments groupés, caractéristiques, d'urée xanthylée (fort grossissement du microscope).

1 cent. cube de liqueur et 0 c. c. 10 de xanthidrol alcoolique 1/20 abandonnent des flocons d'urée après 10 minutes environ.

B. — Le même résultat peut être obtenu sans qu'il soit nécessaire de chauffer le mélange.

Dans un tube à essais contenant :

MnO<sup>4</sup>K pulvérisé . . . . . 0 gr. 7

Liqueur titrée d'ammoniaque (1 c. c. = 0,00994) . 1 cent. cube.

on place un agitateur, on mélange les deux produits puis on introduit :

Solution de glucose 1/10 . . . . . 1 cent. cube,

Le tout est aussitôt brassé énergiquement et l'opération poursuivie jusqu'à disparition complète de toute trace de coloration violette.

On essore sur un petit filtre à succion la bouillie brune, mélangée à de l'acide acétique (2 cent. cubes) et traite le filtrat incolore par un peu de xanthidrol dissous dans l'acide acétique.

L'urée xanthylée commence à apparaître après 2 à 3 minutes.

## CHAPITRE IV

### FORMATION DE L'URÉE PAR OXYDATION DU GLUCOSE ET DE L'AMMONIAQUE PRISE A DES CONCENTRATIONS DU MÊME ORDRE DE GRANDEUR OU PLUS FAIBLES ENCORE QUE CELLES OU L'ON RENCONTRE CETTE BASE DANS L'ORGANISME

Voici, pour fixer les idées, un tableau qui représente la quantité d'ammoniaque contenue dans 1.000 grammes de sang ou d'organes frais de chien, d'après Horodyski, Salaskin et Zaleski (1).

(1) HORODYSKI, SALASKIN et ZALESKI., *Zeitschrift für physiol. Chem.*, 1902, t. XXXV, p. 246; *Chemisches Centralblatt*, 1902, 2, p. 290.



Ces résultats ont été obtenus avec beaucoup de soin, en titrant l'ammoniaque dégagée dans le vide, vers  $+ 30^{\circ}$ , par les liquides ou les tissus mélangés de magnésie pure, récemment calcinée.

	PENDANT LE JEUNE	PENDANT LA DIGESTION
Artère crurale. . . . .	0,0042	0,0041
Veine porte . . . . .	0,0129	0,0185
Veine pancréatique duodénale. . . . .		0,007
Veine mésentérique supérieure . . . . .	0,0095	
Veine iliaque commune . . . . .	0,008	
Muscle. . . . .	0,1436	0,1294
Cerveau . . . . .	0,1119	0,1195
Rein. . . . .	0,1507	0,1479
Muqueuse gastrique. . . . .	0,2909	0,3649
Muqueuse intestinale . . . . .	0,1872	0,3242
Foie . . . . .	0,1751	0,2327
Pancréas . . . . .	0,212	0,2209
Rate . . . . .	0,1945	0,1458
Contenu de l'estomac . . . . .		0,1976
Contenu de l'intestin . . . . .		0,2644

Les solutions, soumises à l'oxydation dans les expériences qui vont être décrites, contiennent, avec la même teneur en glucose que le sang, des quantités variables d'ammoniaque; chacune d'elles renferme par litre 1 gr. 5 de glucose et une dose d'ammoniaque comprise entre 0 gr. 10 et 0 gr. 01.

Cinq séries d'expériences ont été instituées avec les titres suivants en ammoniaque par litre : 0 gr. 10 ; 0 gr. 08 ; 0 gr. 05 ; 0 gr. 025 et 0 gr. 01.

*Formation de l'urée par oxydation d'une solution de glucose contenant 0 gr. 10 d'ammoniaque par litre.*

On place au-dessus d'un bain-marie bouillant un ballon, dont le bouchon est traversé par un tube réfrigérant et un thermomètre, contenant :

Liqueur titrée d'ammoniaque (1 c.c. = 0,000994) .	100 cent. cubes.
Glucose pur . . . . .	1 gr. 5
Eau, quantité suffisante pour . . . . .	1.000 cent. cubes.

Dès que la température atteint  $70^{\circ}$ , on enlève le ballon du bain pour introduire

MnO <sup>4</sup> K pur . . . . .	10 gr. 5
----------------------------------	----------

On agit énergiquement, la réduction du caméléon commence et la température s'élève de quelques degrés au-dessus de 70°. Le vase est replacé au bain-marie et agité de temps en temps. Température maximum : 74°. Lorsque tout le permanganate a disparu, on essore à la trompe, acidule légèrement le filtrat incolore par de l'acide acétique et évapore au bain-marie dans une capsule évasee.

Le résidu sirupeux, introduit dans une éprouvette graduée, occupe un volume de 5 cent. cubes, on lui ajoute l'acide acétique provenant du lavage des parois de la capsule avec 5 cent. cubes de ce réactif. On rince encore le vase avec de l'acide acétique que l'on introduit ensuite dans l'éprouvette de manière à former un volume liquide de 10 cent. cubes. La liqueur filtrée et traitée par du xanthidrol acétique se trouble peu après. Une goutte examinée au microscope (fort grossissement) apparaît peuplée de cristaux étoilés d'urée.

*Formation de l'urée par oxydation d'une solution de glucose contenant par litre 0 gr. 08 d'ammoniaque.*

PROPORTION DES RÉACTIFS.

Glucose pur . . . . .	1 gr. 5
Liqueur titrée d'ammoniaque (1 c. c. = 0,000994) . . . . .	80 cent. cubes.
D'où ammoniaque . . . . .	0 gr. 07952
Eau distillée . . . . .	920 cent. cubes.
MnO <sup>4</sup> K . . . . .	10 gr. 40

*Mode opératoire.* — La solution de glucose et d'ammoniaque contenue dans un ballon dont le bouchon porte un tube réfrigérant et un thermomètre, chauffée à 70°, est additionnée du permanganate, puis agitée. L'oxydation commence aussitôt et le thermomètre accuse une élévation de température de 2° environ.

Le mélange, plongé et chauffé dans un bain d'eau, prend et conserve la température de 71°. On agit de temps en temps. Après 2 heures, le permanganate ayant complètement disparu, on essore à la trompe et l'on évapore au bain-marie, à un très petit volume, le filtrat incolore légèrement acétifié.

Le produit mesure 5 cent. cubes, on étend son volume à 10 cent. cubes avec de l'acide acétique ayant servi à laver la capsule.

La liqueur, filtrée et traitée par du xanthidrol acétique, se trouble légèrement après 30 minutes. Après 20 heures on décante la partie liquide et traite le léger dépôt par quelques cent. cubes d'alcool. La partie insoluble est formée d'une multitude de petits cristaux d'urée groupés en étoile.

*Formation de l'urée par oxydation d'une solution de glucose contenant 0 gr. 05 d'ammoniaque par litre.*

PROPORTION DES RÉACTIFS.

Glucose pur . . . . .	1 gr. 5
Liqueur titrée d'ammoniaque (1 c.c. = 0,000994) . . . . .	50 cent. cubes.
D'où ammoniaque . . . . .	0 gr. 0497
Eau . . . . .	950 cent. cubes.
MnO <sup>4</sup> K . . . . .	10 gr. 40

On opère exactement comme dans l'expérience précédente.

Le produit de l'évaporation (4 cent. cubes) est traité par son volume d'acide acétique contenant un peu de xanthidrol. L'urée apparaît après quelque temps sous forme de petits flocons en suspension dans le liquide et en dépôt au fond du vase. Après 20 heures environ, on décante, délaye le résidu dans l'alcool et examine au fort grossissement du microscope une gouttelette du mélange. On y voit un grand nombre de petites masses sphériques, groupées en colonies, formées elles-mêmes de petits cristaux d'urée réunis en étoile.

*Formation de l'urée par oxydation d'une solution de glucose contenant 0 gr. 025 d'ammoniaque par litre.*

PROPORTION DES RÉACTIFS.

Glucose pur . . . . .	3 grammes.
Liqueur titrée d'ammoniaque (1 c.c. = 0,00994). . . . .	5 cent. cubes.
D'où ammoniaque . . . . .	0 gr. 0497
Eau distillée. . . . .	2.000 cent. cubes.
MnO <sup>4</sup> K . . . . .	20 gr. 80

Dans la solution de glucose et d'ammoniaque portée à 68°, on introduit le permanganate et agite jusqu'à dissolution. Le liquide se trouble aussitôt en formant du peroxyde de manganèse, le thermomètre s'élève à 70°. On maintient cette température en chauffant au bain d'eau le ballon réactionnel surmonté d'un tube réfrigérant, on agite fréquemment.

Après 2 h. 45 de chauffage, la bouillie brune essorée donne une liqueur très légèrement teintée en rose, qui se décolore au bain-marie.

Le résidu sec de l'évaporation est épuisé par l'alcool absolu et le filtrat évaporé complètement dans une capsule de porcelaine. Des flocons d'urée se déposent de la liqueur obtenue en lavant la capsule avec un peu d'acide acétique qu'on additionne ensuite de xanthidrol.

*Formation de l'urée par oxydation d'une solution de glucose contenant un centigramme (0 gr. 01) d'ammoniaque par litre.*

A. — PROPORTION DES RÉACTIFS.

Glucose (1 gr. 5 $\times$ 4) . . . . .	6 grammes.
Liqueur titrée d'ammoniaque pure (1) (1 c. c. = 0 gr. 001). . . . .	40 cent. cubes.
D'où ammoniaque . . . . .	0 gr. 04
Eau . . . . .	4 litres.
MnO <sup>4</sup> K (10 gr. 4 $\times$ 4) . . . . .	41 gr. 6

On opère comme précédemment. Après 5 heures de chauffage à 70°, le filtrat incolore est distillé *à sec* dans le vide au bain-marie. Les liqueurs provenant de l'épuisement du résidu par l'alcool absolu, évaporées à sec dans une capsule au bain-marie, ne laissent qu'un très léger enduit qui disparaît au contact d'acide acétique cristallisable.

La solution est additionnée d'un peu de xanthidrol sec puis de quelques gouttes d'eau. Le lendemain une gouttelette du liquide floconneux examinée au microscope montre des colonies de petites sphères, formées de petites aiguilles groupées en étoiles.

B. — PROPORTION DES RÉACTIFS.

Glucose (1 gr. 5 $\times$ 5) . . . . .	7 gr. 5
Liqueur titrée d'ammoniaque pure (1 c. c. = 0,001) . . . . .	50 cent. cubes.
D'où ammoniaque . . . . .	0 gr. 05
Eau . . . . .	5 litres.
MnO <sup>4</sup> K (10 gr. 4 $\times$ 5) . . . . .	52 grammes.

Durée du chauffage à 70° : 5 heures.

Même mode opératoire que pour A.

Même résultat.

(1) Provenant du chauffage de l'oxalate d'ammoniaque pur avec de la potasse dans l'appareil Schloësing.

## QUATRIÈME PARTIE

### DÉMONSTRATION DE LA PRÉSENCE DE L'URÉE CHEZ LES INVERTÉBRÉS

Riche, Lacaze, Duthiers, Sirodot, Voit, P. Bert, Rabuteau et Papillon, Joly et Regnard, Frédéricq. Krukenberg, Griffiths et Follows, Letellier, Lindeman, Halliburton, Rywosch, Henze et Sanzo ont signalé l'existence de l'urée chez les Invertébrés.

Dans son traité : *L'Urine* (1911), Neuberg mentionne que la présence de l'urée chez les Invertébrés n'aurait pu, dans aucun cas, être établie selon V. Fürth. Les expériences de Sanzo tendraient cependant à rendre vraisemblable, jusqu'à un certain point, la présence de ce corps chez les Échinodermes, les Mollusques et les Crustacés : « Das Vorkommen von Harnstoff bei wirbellosen Tiere ist, nach V. Fürth, bisher in keinem Falle bewiesen. Neuere Untersuchungen von Sanzo machen es allerdings bis zu einem gewissen Grade wahrscheinlich, das bei Echinodermen, Mollusken und Crustaceen auch der Harnstoff als Endproduct des Eiweissstoffwechsels vorkommt. »

Chez les Invertébrés, terrestres ou marins, que nous avons pu nous procurer, l'urée a été indiscutablement mise en évidence à l'aide de sa combinaison xanthylée :



Celle-ci a été obtenue en partant :

1° D'extraits alcooliques animaux, évaporés au bain-marie dans le vide ;

2° De sucs cellulaires non concentrés, partiellement dépouillés de leurs protéiques, à froid, par l'acide acétique seul ou accompagné de chlorure de sodium ;

3° De l'eau de source ou de mer, dans laquelle avaient vécu, plus ou moins longtemps, divers individus aquatiques.

1. CARACTÉRISATION DE L'URÉE A PARTIR D'EXTRAITS ALCOOLIQUES CONCENTRÉS DANS LE VIDE.

*Écrevisse.* — Dans 5 litres d'alcool acétifié à 1/1.000, on place



en macération, 24 heures, la bouillie résultant du broyage de 100 écrevisses vivantes (2 kilogr. 850), préalablement lavées, durant 4 heures, dans un courant d'eau.

Le produit solide de l'expression est soumis à deux traitements successifs semblables et la liqueur colorée obtenue, distillée à sec, au bain-marie, sous pression réduite. La solution du résidu de la distillation dans l'acide acétique, étendu de son volume d'eau (700 cent. cubes), est additionnée de xanthydrol (2 grammes). La même addition est répétée le lendemain ainsi que le surlendemain. La force centrifuge sépare du mélange un dépôt, peu important, et, en plus grande quantité, une matière surnageante, imprégnée d'huile. Le produit solide, rosé, débarrassé des graisses par l'alcool, épuisé par la pyridine dans l'appareil Soxhlet, donne une solution colorée, presque infiltrable et des cristaux qu'on isole par centrifugation, lave à la pyridine froide et dissout dans ce liquide à l'ébullition.

L'urée dixanthylée, suffisamment pure pour l'analyse, se dépose par refroidissement.

Dosage de l'azote (méthode de Dumas). Trouvé N p. 100 . . . 6,81

Calculé pour  $\text{CO} \left[ \text{NH}-\text{CH} \begin{array}{c} \text{C}^6\text{H}^4 \\ \text{C}^6\text{H}^4 \end{array} \text{O} \right]^2$  . . . . . 6,66

Temps nécessaire pour produire la fusion-décomposition de la matière, enfermée en tube clos, plongé dans la vapeur d'oxyde de phényle en ébullition (261° corr.) : 8 minutes.

Rendement en produit pur : 0 gr. 70 environ.

## 2. PRÉCIPITATION DIRECTE DE L'URÉE A PARTIR DE SUCS CELLULAIRES NON CONCENTRÉS.

*Ver à soie.* — Des chenilles de ce Lépidoptère (250 grammes), préalablement lavées à l'eau, sont écrasées dans un mortier, en présence de 1/10 d'acide acétique. Le produit, contenant en assez notable quantité des fragments de feuilles de mûrier non digérées, est exprimé à la presse et le suc, encore trouble après centrifugation (188 cent. cubes), pourvu de xanthydrol (0 gr. 04).

Le dépôt, recueilli après 24 heures, purifié par les alcalis et l'alcool, cède à ce solvant à l'ébullition de l'urée dixanthylée, qui cristallise par refroidissement et nécessite pour fondre, en

se décomposant, 12 minutes de chauffage à 261° (corr.).

Des eaux-mères acétiques, on retire encore de l'urée xanthylée, 24 heures après l'addition d'une nouvelle dose de xanthhydrol. La recherche de l'urée, *par la même méthode*, dans la feuille de mûrier, privée de nervures, ne donne pas de résultat positif en opérant sur 250 grammes.

### 3. — EXCRÉTION DE L'URÉE PAR LES INVERTÉBRÉS.

*Etoile de mer.* — On tapisse complètement de ces phytozoaires le fond d'une cuve de verre et on les recouvre d'une légère couche d'eau de mer. Après 40 heures, les animaux étant encore bien vivants, le liquide d'immersion, de couleur rosée, est traité par 1/10 d'acide acétique, filtré et additionné de 0 gr. 2 p. 1.000 de xanthhydrol dissous dans un peu d'acide acétique.

Le dépôt, recueilli le surlendemain, dissous dans l'alcool à l'ébullition contenant quelques gouttes de pyridine, donne des cristaux un peu rosés (0 gr. 01) nécessitant un chauffage de 8 minutes à 261° (corr.) pour être fondus en un liquide brun.

Deux expériences semblables, effectuées à une autre époque (1), ont conduit au même résultat positif.

L'eau utilisée dans cette expérience et dans d'autres du même genre, provenait du même réservoir et ne renfermait pas d'urée, décelable par la méthode employée pour précipiter cette substance des sucs ou des macérations animales.

4. L'urée a été identifiée chez les animaux qui suivent :

#### *Cœlentérés.*

*Actinie.* — Produits d'excrétion cédés à de l'eau de mer ambiante.

#### *Échinodermes.*

*Etoile de mer.* — Produits d'excrétion cédés à de l'eau de mer ambiante.

#### *Vers.*

*Sangsue officinale.* — Suc cellulaire. Produits d'excrétion.

(1) Au laboratoire maritime du Portel, aimablement mis à notre disposition par M. P. Hallez.

*Crustacés.*

*Écrevisse.* — Suc cellulaire de l'animal entier.

Suc cellulaire de la chair privée du foie et des autres organes.

Produits d'excrétion cédés à de l'eau de source.

*Langouste.* — Suc cellulaire.

Produits d'excrétion cédés à de l'eau de mer ambiante.

*Crevette.* — Suc cellulaire.

*Insectes.*

*Ver à soie.* — Suc cellulaire.

*Fourmi.* — Œuf.

*Mouche.* — Œuf.

*Mollusques.*

*Escargot.* — Suc de l'animal entier.

Produits de sécrétion et d'excrétion.

*Anodonte* (1). — Eau incluse dans les écailles.

Produits d'excrétion cédés à de l'eau de source.

*Moule.* — Eau incluse dans les écailles.

*Huître (de Zélande).* — Eau incluse dans les écailles.

(1) Nous devons à l'obligeance de M. A. Malaquin d'avoir pu effectuer des expériences sur ce Lamellibranche.

(A suivre.)

## ERRATUM

Dans la Première Partie de ce Mémoire, p. 590, après la 10<sup>me</sup> ligne (*Réactif de Tanret concentré*), ajouter la ligne suivante :

Eau, quantité suffisante pour obtenir un volume de 100 cent. cubes.

## UNE AMIBE A PELLICULE, COMMENSALE D'UN LICHEN

par M. et M<sup>me</sup> FERNAND MOREAU

(Travail du Laboratoire de M. Dangeard.)

Depuis le travail de Dujardin (1) sur les Infusoires vivant dans les Mousses, on a décrit un certain nombre d'Amibes étranges qui réussissent à mener une vie aéricole parmi les rhizoïdes et les tiges de ces végétaux à la faveur d'une membrane pelliculeuse mince, souple, mais résistante, qui leur permet de supporter plusieurs jours la sécheresse et de reprendre leur vie habituelle lorsque reviennent les jours humides. Elles se rapportent au groupe de l'*Amœba terricola* et constituent les « Amibes à pellicule » ainsi que les appelle Penard (2).

C'est une Amibe de ce groupe que nous avons rencontrée, non parmi les Mousses, mais parmi les hyphes d'un Lichen. Ce Lichen est un *Peltigera*, le *Peltigera polydactyla*, c'est-à-dire un Lichen terrestre, dont les thalles aplatis reposent sur le sol par une large surface. Il est constitué à la face inférieure par des filaments enchevêtrés, de grand diamètre, aux membranes souvent épaisses et qui forment les couches les plus inférieures du tissu connu sous le nom de médulle. Dans quelques-uns des exemplaires que nous avons examinés, ces hyphes inférieurs de la médulle étaient parasités par un Champignon qui entremêlait ses filaments à ceux du *Peltigera*, particulièrement sur les bords du thalle, à l'endroit où, se relevant légèrement, ils cessent d'être étroitement appliqués sur le sol. Il s'agissait d'un Discomycète, *Agyrium flavescens* Rehm, dont les filaments sont, au contraire de ceux de la portion avoisinante de la médulle du *Peltigera*, des hyphes de petit calibre. On verra bientôt quelle est l'importance de la présence de ce parasite et de sa structure pour l'Amibe pelliculeuse qui fait l'objet de cette note.

Celle-ci est une Amibe de petites dimensions, surtout si on

(1) DUJARDIN, Note sur les Infusoires vivant dans les Mousses, 1832.

(2) E. PENARD, Observations sur les Amibes à pellicule. *Arch. f. Protist.*, Bd 6, 1905.

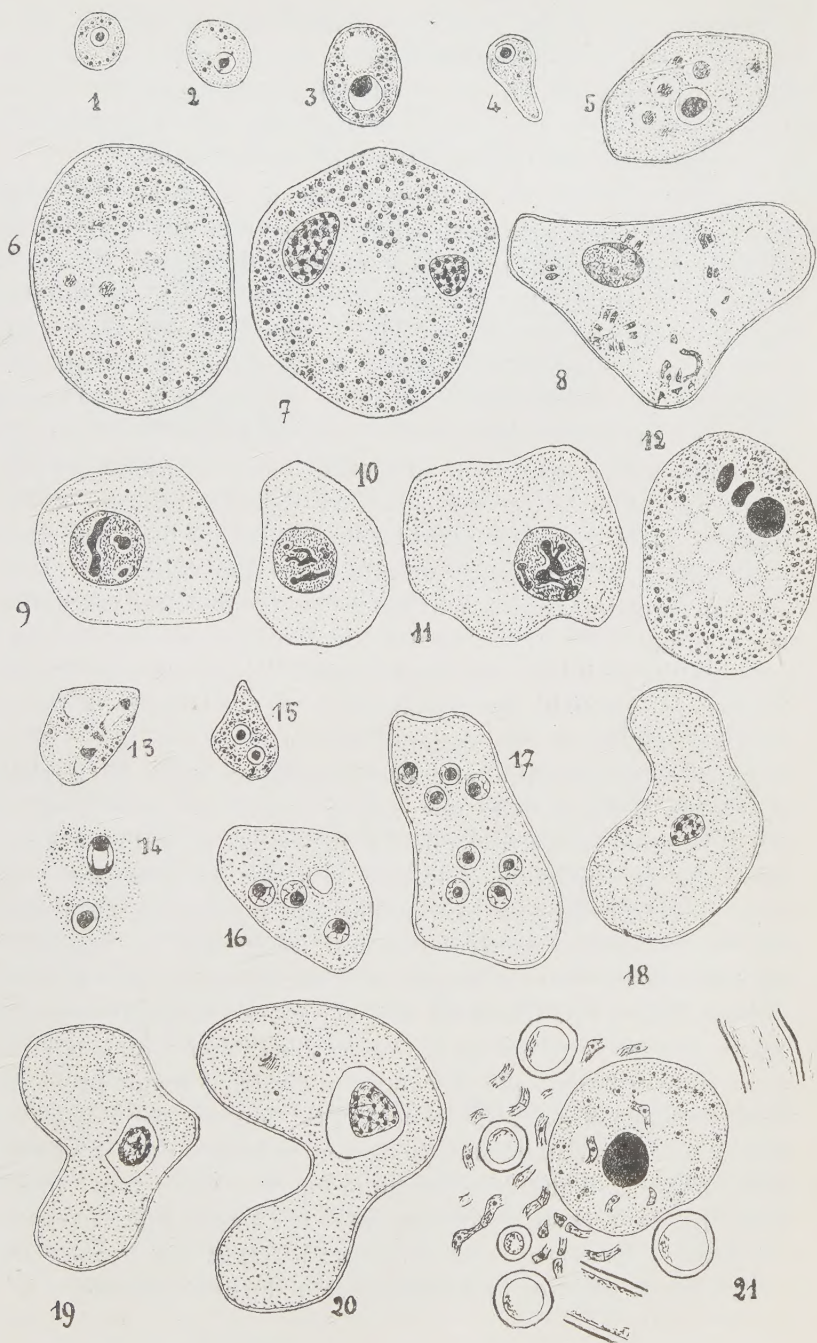


la compare aux Amibes géantes que sont, le plus souvent, les Amibes à pellicule. Sa taille, ordinairement de 15 à 20  $\mu$ , ne dépasse jamais 40  $\mu$ ; elle mesure parfois 6  $\mu$  chez les exemplaires jeunes. Nous la considérons comme une forme naine de l'*Amœba sphæronucleolus* (Greeff) à laquelle elle ressemble par la plupart de ses caractères.

C'est une amibe sphérique ou subsphérique (fig. 1, 2, 3) rarement déformée, rarement pourvue de pseudopodes (fig. 4); c'est une Amibe paresseuse. Elle est entourée d'une pellicule hyaline, transparente, fine, souvent appliquée sur le protoplasme. Le protoplasme, granuleux et dense quand l'Amibe est jeune, se vacuolise, surtout au centre, quand elle vieillit (fig. 6, 7, 12). Il renferme un chromidium constitué généralement, dans les Amibes de petite taille, par une couronne pariétale de grains chromatiques (fig. 1) et, dans les Amibes plus âgées, par un grand nombre de chromidies répandues dans tout le protoplasme, moins abondantes cependant dans la région vacuolaire centrale (fig. 3, 6, 7 et 12). Le noyau est ordinairement unique, sphérique, entouré d'une auréole claire; il renferme, le plus souvent, un seul nucléole, gros, généralement arrondi et central (fig. 1, 2, 4) rarement excentrique (fig. 3). Parfois ce nucléole s'étire, se lobe, se divise en fragments tantôt irréguliers, tantôt arrondis, entourés d'une auréole claire (fig. 8, 9, 10, 12); quelquefois il donne naissance à des sphérules réunies entre elles par des filets chromatiques, rectilignes, épais (fig. 11). Dans quelques cas, le noyau est représenté par une masse entièrement granuleuse (fig. 7); cet aspect, que nous n'avons rencontré que chez des Amibes déjà grosses, correspond peut-être à la naissance de chromidies aux dépens du noyau.

Nous avons observé certains stades de la division de ce noyau. Nous avons constaté son allongement en un cylindre pourvu de deux calottes polaires fortement chromatiques et présentant en son milieu deux disques de chromatine plus pâles (fig. 13); nous avons vu les deux noyaux-fils se présenter sous une forme allongée montrant à l'une des extrémités un nucléole arrondi, réuni par quelques filaments à une calotte de chromatine qui occupe l'autre extrémité (fig. 14); nous avons assisté à la reconstitution de ces deux noyaux qui prennent finalement la structure ordinaire à nucléole centra.





Grâce à ces phénomènes de division nucléaire, les plus grosses Amibes peuvent renfermer deux, quatre et jusqu'à huit noyaux (fig. 15, 16, 17). La division de l'Amibe intervient alors (fig. 18, 19, 20 : 3 coupes successives dans une même Amibe); il en résulte des Amibes de petite taille et uninucléées.

Non loin du noyau, le protoplasme de l'Amibe renferme une vacuole à peu près de la taille du noyau et qui se divise en même temps que lui, la vacuole contractile (fig. 2, 3, 13). Il renferme, en outre, des vacuoles digestives; l'étude du contenu de ces dernières est de nature à nous renseigner sur la biologie de l'Amibe : La plupart contiennent des substances amorphes répondant sans doute aux « boulettes » de Penard (fig. 5, 6), mais dans quelques-unes on trouve des fragments de mycélium appartenant, non au Lichen, dont les hyphes médullaires voisins sont trop gros pour être absorbés facilement par l'Amibe, mais au parasite dont les filaments sont beaucoup plus ténus (fig. 8, 21); on les reconnaît à leur faible calibre et à leur structure à cellules courtes, uninucléées, à petit noyau et à membrane mince. Lors de la digestion, le mycélium devient méconnaissable et se transforme en une masse d'apparence homogène.

L'*Amœba sphæronucleolus* emprunte donc à l'*Agyrium flavescens* sa nourriture, ne demandant au *Peltigera* que l'abri. Grâce à sa petite taille, elle peut s'insinuer entre les hyphes du Lichen et du parasite mieux que ne pourraient le faire les autres Amibes terrestres; elle est donc dans ce milieu exigu à l'abri de la concurrence qu'elle pourrait trouver dans les interstices des Mousses accessibles aux espèces plus grandes. Par son enveloppe pelliculeuse, qui lui permet de supporter les alternatives de sécheresse et d'humidité, et par sa taille réduite, elle présente donc des caractères d'adaptation très marqués à la vie parmi les filaments des Lichens, mais elle n'y peut vivre aisément qu'à la condition d'y trouver une proie qui soit conforme à sa taille; elle lui est fournie par l'*Agyrium flavescens*. Une quadruple association se trouve donc réalisée : elle comprend d'abord le Champignon et l'Algue dont l'union constitue le Lichen *Peltigera*, puis le Champignon parasite, *Agyrium flavescens*, enfin l'*Amœba sphæronucleolus* qui emprunte à celui-ci l'aliment, à celui-là une demeure.

Le Gérant : G. MASSON.